

“Mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en la terminación de la dormición de semillas expuestas a las temperaturas alternadas”

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Héctor Roberto Huarte
Ingeniero Zootecnista, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, 1991



FAUBA Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis
Roberto Luis Benech-Arnold
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor of Philosophy. (University of Southampton).

Director de Estudios
Diego Batlla
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Director de tesis
Roberto Luis Benech-Arnold
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor of Philosophy. (University of Southampton).

JURADO

Patricia Noemí Piccoli
Licenciada en Microbiología (Universidad Nacional de Río Cuarto)
Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

JURADO

Ángel Jesús Matilla Cano
Biólogo (universidad de Santiago de Compostela, España)
Doctor en Ciencias (Universidad de Salamanca, España)

JURADO

Luis Amado Mroginski
Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Nordeste)

Fecha de defensa de la tesis: 24 de Septiembre de 2013.

Dedicatorias

A mi esposa Mariana por su amor, estímulo y paciencia diaria. A mis hijos Camila (China) y Patricio (Coco). Los tres me hacen una persona muy feliz.

A mis papás *Chiche* y *Mandy*, que cada día y por siempre estarán en mi corazón.

Al resto de mi familia que siempre se interesó y se alegró con mis avances

Deseo agradecer también todos aquellos que hicieron posible que esta Tesis llegara a su finalización.

Agradecimientos

A los Dres. Roberto Benech-Arnold y Diego Batlla, por su estímulo y contribución con mi formación.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Agrarias y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica Argentina por el apoyo recibido y por haberme otorgado la Beca de Estudio.

A la Dra. María Verónica Rodríguez, por su colaboración con la extracción de GAs y en la etapa inicial de los estudios moleculares. A Silvina Enciso por su ayuda con la extracción y cuantificación del ABA. A la Dra. Érica Duarte Silveira por la lectura y los comentarios realizados sobre los Capítulos 4 y 5.

A todos los integrantes de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires por brindarme un sitio de trabajo y darme la oportunidad de aprender y trabajar junto a ellos. Especialmente a los Doctores Jorge Zavala, Eduardo Pagano, la Ing. Agr. Jéssica Barnetto y la Lic. Natalia Ilina.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Publicaciones derivadas de la tesis

2010. Huarte, R and Benech-Arnold, R.L. Hormonal nature of seed responses to fluctuating temperatures in *Cynara cardunculus* (L.). *Seed Science Research*, 20: 39–45.

2005. Huarte, H.R. and Benech-Arnold, R.L. Incubation under fluctuating temperatures reduces mean base water potential for seed germination in several non - cultivated species. *Seed Science Research*, 15: 89-97.

Huarte, R., Pagano, E., Zavala, J., Luna, V. y Benech-Arnold, R.L. Physiological and molecular mechanisms involved in seed dormancy breakage by Fluctuating temperatures. *Manuscrito en preparación*.

INDICE GENERAL

CAPITULO 1

INTRODUCCION GENERAL	22
Dormición	24
Adquisición y modulación del nivel de dormición en poblaciones de semillas:	25
Factores endógenos	25
Metabolismo y red de señalización del ABA y las GAs	27
Metabolismo del ABA	27
Señalización del ABA	28
Metabolismo de las GAs	29
Señalización de las GAs	31
Etileno y otras hormonas involucradas en la terminación de la dormición	32
Factores ambientales	33
Factores externos terminadores de la dormición: nitratos, luz y temperaturas alternadas	34
Nitratos	34
Luz	43
Terminación de la dormición por exposición de semillas a la luz.	35
Temperaturas alternadas	35
La terminación de la dormición en semillas expuestas a las temperaturas alternadas: Posibles mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares involucrados en esta respuesta	36
Objetivos general	37
Hipótesis de trabajo	37

CAPITULO 2

LA INCUBACION BAJO UN REGIMEN DE TEMPERATURAS ALTERNADAS REDUCE EL POTENCIAL AGUA BASE DE GERMINACION DE VARIAS ESPECIES NO DOMESTICADAS	40
INTRODUCCIÓN	42
MATERIALES Y MÉTODOS	44
Semillas	44
Ensayos de Germinación	44
Análisis de datos	45
RESULTADOS	46
Efecto de las temperaturas constantes o alternadas de incubación sobre el porcentaje final de germinación	46
Análisis hidrotiempo	46
DISCUSION	53

CAPITULO 3

REGULACIÓN HORMONAL DE LA TERMINACION DE LA

DORMICION POR LA EXPOSICION DE SEMILLAS A	
TEMPERATURAS ALTERNADAS”	56
INTRODUCCION	58
MATERIALES Y METODOS	60
Semillas	60
Experimentos de germinación	60
Análisis de hidrotiempo	60
Tratamientos con ABA, GA ₃ , fluridona y paclobutrazol	60
Cuantificación del ABA	61
RESULTADOS	62
Análisis de hidrotiempo de la germinación en semillas incubadas a temperaturas alternadas y semillas incubadas a temperatura constante tratadas con luz roja y GA ₃	60
Papel del ABA en la respuesta de las semillas a las condiciones térmicas de incubación	65
Papel de las GAs en las respuestas de las semillas a las condiciones térmicas de incubación	84
DISCUSION	67
 CAPITULO 4	
EL EFECTO DE LAS TEMPERATURAS ALTERNADAS SOBRE EL BALANCE ABA / GAS: IDENTIFICACION DE LOS SITIOS DE REGULACION	70
INTRODUCCION	72
MATERIALES Y METODOS	74
Semillas	74
Ensayos de germinación	74
Cuantificación de GAs	75
Sensibilidad a las GAs	75
Extracción de RNA y síntesis de cDNA	76
RT-PCR	76
RESULTADOS	79
Determinación de los requerimientos de temperaturas alternadas para la terminación de la dormición	79
Contenido endógeno de GAs durante la incubación	79
Efecto de las temperaturas alternadas sobre la sensibilidad de las semillas al GA _s	81
Análisis bioinformático de secuencias de nucleótidos relacionados con el metabolismo y señalización del ABA y de GAs.	83
Expresión de genes relacionados con el metabolismo y señalización del ABA y de GAs durante la incubación de semillas de <i>C. cardunculus</i> bajo temperaturas alternadas y constantes.	83
DISCUSION	88

CAPITULO 5
DISCUSION GENERAL

92

CAPITULO 6
BIBLIOGRAFIA CITADA

100

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Modelo de regulación hormonal de la dormición y germinación por acción del ABA y GA en respuesta a la temperatura de incubación	30
Figura 1.2. Metabolismo del ABA. Cada caja representa a una enzima. Las cajas con fondo canela representan a las enzimas con una función regulatoria en semillas.	32
Figura 1.3 Componentes de señalización del ABA	33
Figura 1.4 Esquema de la ruta del metabolismo de las giberelinas. Paso de CDP a GGDP en el plastidio. Paso de ent-kaureno a GA ₁₂ en el Retículo endoplasmático. Síntesis de GAs a partir de GA ₁₂ en el citoplasma	37
Figura 2.1. Evolución del porcentaje de germinación de las especies evaluadas en un rango de potenciales osmóticos bajo regímenes térmicos constantes o alternados. El modelo Hidrotiempo fue usado para estimar el potencial agua base medio de la población ($\psi_b(50)$), el desvío estándar del potencial base entre las semillas (σ_{ψ_b}), y la constante hidrotiempo (θ_H).	60
Figura 2.2: Distribución del potencial agua base (ψ_b (g)) de acuerdo con el tratamiento térmico de incubación.	62
Figura 2.3 A-H. Análisis de Hidrotiempo para semillas de <i>Cynara cardunculus</i> bajo diferentes tratamientos térmicos de incubación en un rango de potenciales osmóticos decrecientes.	64
Figura 2.4 A-H. Análisis Hidrotiempo para semillas de <i>Carduus acanthoides</i> bajo diferentes tratamientos térmicos de incubación en un rango de potenciales osmóticos decrecientes.	66
Figura 3.1. Germinación acumulada en función del tiempo de semillas de <i>Cynara cardunculus</i> incubadas a (A) 20°C en potenciales agua decrecientes (B) a 20°C bajo potenciales agua decrecientes luego de un tratamiento con luz roja, (C) a 20°C en presencia de 100 μ M GA ₃ , y (D) a 25/15°C a potenciales agua decrecientes. (E) a (H) Distribución normal de la frecuencia relativa de ψ_b (g) valores correspondientes a las figuras (A) a (D).	81
Figura 3.2. Porcentaje final de germinación en semillas de <i>Cynara cardunculus</i> incubadas en diferentes concentraciones de ABA. Barras abiertas muestran la germinación a temperaturas alternadas (25/15°C) y barras cerradas muestran la germinación a temperatura constante (20°C). Las barras de error muestran los EE. Los experimentos de germinación se condujeron durante 16 días.	83
Figura 3.3. Contenido de ABA (pg/mg aquenio seco) en semillas de <i>Cynara cardunculus</i> a diferentes tiempos de incubación.	84

Figura 3.4. Porcentaje final de germinación de semillas de *Cynara cardunculus* incubadas a temperaturas alternadas (25/15°C) (barras abiertas) o a temperaturas constantes (20°C) (barras cerradas) en diferentes soluciones (ver leyenda por debajo del eje x). 85

Figura 4.1. Evolución de la germinación en semillas de *Cynara cardunculus* (lote 2010) incubadas bajo temperaturas alternadas (20/10°C) y temperaturas constantes (15°C). Los símbolos representan las medias de tres repeticiones y sus respectivos errores estándar. En caso de no mostrarse las barras, el valor del error es menor que el tamaño de los símbolos. 101

Figura 4.2 Dinámica del contenido endógeno de GA₁ (A), GA₄ (B) y GA₈ (C) en semillas incubadas bajo temperaturas alternadas de 20/10°C (símbolos llenos) o constantes de 15°C (símbolos abiertos). Los valores representan a la media de tres repeticiones y su respectivo error estándar. En caso de no mostrarse las barras, el valor del error es menor que el tamaño de los símbolos. 103

Figura 4.3. Determinación del contenido de giberelinas en semillas secas (barras grises) o luego de 5 días de incubación bajo temperaturas alternadas (20/10°C) (barras negras) o constantes (15°C) (barras vacías). Los valores representan a la media de tres repeticiones y su respectivo error estándar. El *inset* muestra el resultado del ensayo de germinación realizado en paralelo al muestreo de embriones para la determinación del contenido de GAs. 104

Figura 4.4 A y B. Porcentaje final de germinación en semillas de *Cynara cardunculus* incubadas a temperaturas alternadas (20/10°C) (símbolos cerrados) o a temperatura constante (15°C) (símbolos abiertos) incubadas en diferentes soluciones (ver leyenda por debajo del eje horizontal). Los ensayos de germinación fueron conducidos durante 21 días. Cada símbolo representa el valor promedio de tres repeticiones mientras que las barras verticales representan el error estándar de la media. 105

Figura 4.5 A: Acumulación de transcritos de *CycaNCED* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. **B:** Intensidad de banda de *CycaNCED* en relación con la observada para Actina. Se muestran los valores de tres repeticiones por tratamiento \pm EEM. 109

Figura 4.6 A: Acumulación de transcritos de *CycaCYP707A* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. **B:** Intensidad de banda de *CycaCYP707A* en relación con la observada para Actina. 109

Figura 4.7 A: Acumulación de transcritos de *CycaABI5* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 0 (Secas), 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. B: Intensidad de banda de *CycaABI5* en elación con la observada para Actina. 110

Figura 4.8 A: Acumulación de transcritos de *CycaGA3ox* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. B: Intensidad de banda de *CycaGA3ox* en relación con la observada para Actina. Se muestran los valores de tres repeticiones por tratamiento \pm EEM. 111

Figura 4.9 A: Acumulación de transcritos de *CycaRGL2* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 0 (Secas), 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. B: Intensidad de banda de *CycaABI5* en relación con la observada para Actina. 112

Figura 4.10 A: Acumulación de transcritos de *CycaGAI* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 0 (Secas), 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. B: Intensidad de banda de *CycaGAI* en relación con la observada para Actina. 112

Figura 4.11 Cambios en el contenido, y señalización hormonal en función del tratamiento térmico de incubación. 118

Figura 5.1 Modelo general de las respuestas producidas en las semillas de *Cynara cardunculus* expuestas a temperaturas alternadas y constantes 126

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Parámetros del modelo Hidrotiempo que caracterizan la germinación de las especies evaluadas incubadas bajo regímenes de temperaturas alternadas o temperatura constantes. El modelo Hidrotiempo fue usado para estimar el potencial agua base medio de cada población de semillas ($\psi_b(50)$), el desvío estándar del potencial agua base entre la población de semillas (σ_{ψ_b}), la constante hidrotiempo (θ_H) a partir de los tiempos a germinación en un rango de potenciales agua. Los coeficientes de determinación (r^2) indican la fracción de la variación total explicada por el modelo.

61

Tabla 4.1 Primers usados para amplificación de cDNA

100

ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

ABA-GE: ABA-Glucosil ester

ABI: insensible al ABA

ABRE: elementos que responden al ABA

ACO: 1-aminociclopropano- 1-ácido carboxílico oxidasa

BRs: Brasinoesteroides

cDNA: DNA complementario

CDP: *ent*-copalil difosfato

CPS: *ent*-copalildifosfato sintasa

CTR1: (constitutive triple response 1) respuesta triple constitutiva

Cyca NCED: secuencia de *Cynara cardunculus* con alta similitud con *NCED*

CycaABI5: secuencia de *Cynara cardunculus* con alta similitud con *ABI5*

CycaActina: secuencia de *Cynara cardunculus* con alta similitud con *Actina*

CycaCYP707: secuencia de *Cynara cardunculus* con alta similitud con *CYP707A*

CycaGA3ox: secuencia de *Cynara cardunculus* con alta similitud con *GA3oxidasa*.

CycaGAI: secuencia de *Cynara cardunculus* con alta similitud con *GAI*.

CycaRGL2: secuencia de *Cynara cardunculus* con alta similitud con *RGL2*.

dNTP: dinucleótidos

DPA: ácido dihidrofaseico

EEM: error estándar de la media

EIN2: (etileno insensible 2) insensible al etileno 2

EREBPs : factores de transcripción que se unen a elementos responsivos al etileno

ERFs,: factores de transcripción responden al etileno

etr 1: (etileno triple response 1) respuesta triple al etileno
GA3ox: giberelina 3- β oxidasa

GAI: insensible al GA

GAs: giberelinas

GGDP: geranilgeranildifosfato

HIR: respuesta a alta irradiancia

JA: Jasmonatos

KAO: *ent*-kaurenoico oxidasa

KS: *ent*-kaureno sintasa

LC-MS-MS: Cromatógrafo líquido acoplado a un doble masas

LFR: respuesta de baja fluencia

MeOH: metanol

mg: miligramos

mM: mili molar

mRNA: RNA mensajero

NCED: 9*cis* Epoxicarotenoide Dioxigenasa

PA: acido faseico

PCB: paclobutrazol

PEG: polietilenglicol

PFD: densidad de flujo de fotones

Pfr/Ptotal: relación entre Pfr y el total de fitocromos

Pfr: fitocromo con máxima absorción en la zona del rojo lejano que absorbe luz roja lejana

pg: pico gramos

Pr: fitocromo con máxima absorción en la zona del rojo lejano

RGL2: represor de *ga 1-3* semejante a 2

RMSE: raíz del error cuadrático de la media

RNA: ácido ribonucleico

RT: transcripción reversa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

TA: temperaturas alternadas

TC: temperaturas constantes

TE: Trinexapac-ethilo

VLFR: respuesta a muy baja radiación

VP1: viviparous 1

ZEP: zeaxantina epoxidasa

SIMBOLOS

Θ_H : constante hidrotiempo

$\sigma_{\psi b}$: desvío estándar del ψ_b

Ψ : potencial osmótico

Ψ_b : potencial agua base

RESUMEN

Esta tesis determina los mecanismos fisiológicos intervinientes en la terminación de la dormición en semillas de *Cynara cardunculus* y otras especies no domesticadas a las temperaturas alternadas. La comprensión de los mecanismos fisiológicos, se inició a partir de la comparación de los parámetros resultantes de la aplicación del modelo de hidrotiempo. Se observó que las temperaturas alternadas redujeron el potencial agua base para la germinación ($\psi_{(b)50}$). Este hecho denota que las temperaturas alternadas incrementan la capacidad del embrión para superar aquellas restricciones de origen físico y/o endógeno que impiden su crecimiento. El incremento del potencial de crecimiento del embrión está regulado hormonalmente donde las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GAs) ejercen respectivamente, roles antagónicos en el mantenimiento de la dormición y en la promoción de la germinación. En las semillas expuestas a las temperaturas alternadas, se observó un menor contenido y una pérdida de la sensibilidad al ABA. Por el contrario, no se observaron cambios en el contenido y/o en la sensibilidad a las GAs de las semillas entre ambos regímenes térmicos de incubación. Además, se observó que el mantenimiento de la dormición en las semillas expuestas a temperaturas de incubación constantes fue producto del incremento en la biosíntesis *de novo* del ABA. Los mecanismos hormonales por los cuales las temperaturas alternadas terminan con la dormición, se encontrarían regulados a nivel de la expresión de genes, siendo posible destacar la correspondencia observada entre la reducción en el contenido y en la sensibilidad al ABA bajo temperaturas alternadas y la menor abundancia de los transcritos de *NCED* y de *ABI5* involucrados en la síntesis y en la señalización del ABA.

PALABRAS CLAVE: Dormición, temperaturas alternadas, *Cynara cardunculus*, modelo hidrotiempo, ácido abscísico, giberelinas, *NCED*, *ABI5*.

“Physiological and molecular mechanisms involved in seed dormancy termination by fluctuating temperatures”

ABSTRACT

This thesis describes the physiological mechanisms involved in seed dormancy termination of *Cynara cardunculus* and some other non-domesticated species by fluctuating temperatures. The understanding of physiological basis to responses to fluctuating temperatures, started from the comparison of the parameters resulting from the application of hydrotime model. Fluctuating temperatures shifted mean base water potential ($\psi_b(50)$) values downwards. This finding implies that fluctuating temperatures terminates seed dormancy through an enhancement of embryo potential to overcome a physical restraint for germination. The increase in the embryo growth potential is hormonally regulated, where abscisic acid (ABA) and gibberellins (GAs) play respectively antagonistic roles in maintaining dormancy and promote germination. Seeds exposed to fluctuating temperatures, showed a lower ABA content and a loss of ABA sensitivity. In contrast, no changes in GAs content and sensitivity were registered among seeds incubated at fluctuating or constant temperatures. It was founded that dormancy maintenance in constant temperature-treated seeds was due to the increase in ABA *de novo* biosynthesis. The hormonal mechanisms, by which fluctuating temperatures terminates dormancy, would be regulated at the level of gene expression. Indeed the reduction of ABA content and sensitivity by fluctuating temperatures was in agreement with the low abundance of *NCED* and *ABI5* transcripts involved in ABA synthesis and signaling.

KEY WORDS: Seed dormancy, fluctuating temperatures, *Cynara cardunculus*, hydrotime model, ABA, gibberellins, *NCED*, *ABI5*

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Dormición

El término dormición se refiere al estado de la planta entera o alguno de sus órganos (*i.e.* semillas, yemas, tubérculos y bulbos), caracterizado por un cese temporario de su crecimiento y desarrollo (Hilhorst *et al.*, 2010). En semillas viables e intactas, la dormición se define como una imposibilidad temporaria para completar la germinación ante el conjunto de condiciones favorables (*e.g.* temperatura, luz, O₂, disponibilidad hídrica) para las semillas no-dormidas (Linkies *et al.*, 2010). La dormición confiere a las poblaciones de semillas una ventaja adaptativa clara, ya que evita que el proceso de germinación ocurra bajo condiciones ambientales que desencadenarían una muerte prematura de las plántulas y reduce la competencia entre individuos de la misma especie (Finkelstein *et al.*, 2008). La dormición ha evolucionado diferencialmente entre especies siendo al presente frecuentemente observable en muchas especies no domesticadas y en poblaciones de malezas. En contraste y con el objetivo de obtener altos rendimientos, las especies cultivadas han sido seleccionadas intensamente en contra de este rasgo con el propósito de obtener una germinación rápida y uniforme (Benech-Arnold *et al.*, 2000).

La dormición impone una demora entre el tiempo de dispersión de las semillas y la germinación. No obstante, las causas que originan la dormición son variables. En las últimas décadas, fueron propuestos sucesivos modelos para la clasificación de la dormición. Entre ellos es posible destacar los trabajos realizados por Harper (1959), Nikolaeva (1977), Bewley y Black (1994), Hilhorst (1995) y más recientemente por Baskin y Baskin (2004). Estos últimos autores, retomando la propuesta de Nikolaeva, elaboraron un sistema de clasificación donde se distinguen cinco clases de dormición: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física y un último tipo resultante de la combinación entre la dormición fisiológica y la física. La dormición fisiológica es el tipo de dormición observable más frecuentemente en semillas de especies que habitan climas templados y que pertenecen a varias familias (Crucíferas, Asteráceas y Solanáceas) (Linkies y Leubner-Metzger, 2011). La disminución y posterior salida de este estado requiere que las semillas perciban señales específicas del ambiente (*e.g.* frío, luz) (Linkies *et al.*, 2010). La dormición fisiológica resulta de la acción de una serie de mecanismos sujetos a regulación hormonal que culminan en una restricción sobre el crecimiento del embrión en las semillas embebidas; de no actuar estos mecanismos, el crecimiento del embrión es reanudado como resultado del proceso de germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La dormición fisiológica se divide posteriormente en dos subcategorías, no profunda y profunda, según las semillas respondan o no respectivamente a tratamientos con reguladores de crecimiento como el ácido giberélico (GA) que promueven la germinación.

La dormición de origen morfológico se observa en semillas con embriones inmaduros o muy pequeños comparados con el tamaño de la semilla entera (*i.e.* relación embrión: semilla < 0.1); las semillas que la presentan no tienen dormición fisiológica y necesitan más tiempo para germinar. La dormición de naturaleza morfofisiológica está presente en semillas que presentan conjuntamente embriones pequeños y un componente de dormición del tipo fisiológico. La dormición de origen física está causada por cubiertas impermeables al agua y por último la dormición producto de la acción conjunta de componentes físicos y fisiológicos (Finch Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Los diferentes tipos de dormición se inducen durante el desarrollo de las semillas, estableciéndose la denominada dormición de tipo primaria (Hilhorst, 1995). La

dormición primaria alcanza su nivel más elevado en cercanías de la madurez fisiológica de las semillas, para decaer luego de ser dispersadas o cosechadas desde la planta madre a un ritmo particular para cada semilla, especie o genotipo y de su interacción con el ambiente. Las semillas de especies con una salida de la dormición lenta permanecen en el suelo meses o años formando parte de los denominados bancos de semillas persistentes. Por el contrario, aquellas poblaciones de semillas con una rápida salida de la dormición y una breve persistencia en el suelo forman bancos de semillas transitorios (Buhler *et al.*, 1998). El diferente grado de dormición que presentan las semillas dentro de una misma población permite una distribución amplia en el tiempo de la germinación con la consecuente exploración de diferentes condiciones ambientales por parte de las plántulas generadas (Benech-Arnold *et al.*, 2000).

Adquisición y modulación del nivel de dormición en poblaciones de semillas: Influencia de factores endógenos y ambientales

I) Factores endógenos

El ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GAs) son consideradas las hormonas principales en la inducción de la dormición y la promoción de la germinación de semillas (Kucera *et al.*, 2005). Estas biomoléculas son necesarias en la transferencia de la información del ambiente a las semillas y bajo su influencia se modulan los cambios en el nivel de dormición de semillas (Yamaguchi *et al.*, 2008). Si bien la participación de ambas hormonas sigue siendo central en el control de este estado, es cada vez mayor la información disponible sobre la participación de otras hormonas como el etileno, las auxinas y los jasmonatos cumpliendo diferentes roles en el mantenimiento y salida de la dormición (Finkelstein *et al.*, 2008; Linkies y Leubner-Metzger, 2012). Múltiples líneas de evidencia señalan al ABA como responsable de la inducción y del mantenimiento de la dormición (Finkelstein *et al.*, 2008). En efecto, niveles elevados de ABA se acumulan durante el periodo medio y tardío de la embriogénesis para asegurar el desarrollo normal de las semillas, inducir la dormición y evitar la germinación precoz (Kucera *et al.*, 2005). Un déficit de ABA, debido a mutaciones o por la utilización de inhibidores químicos de su biosíntesis, establece un nivel de dormición reducido al momento de la dispersión. Por el contrario, la sobreexpresión de genes responsables de la síntesis de enzimas participantes en la síntesis del ABA, incrementa el nivel de dormición o demoran la germinación (Nambara y Marion-Poll, 2003). La evidencia experimental reporta que para la inducción del estado de dormición, solamente es efectivo el ABA producido en el embrión (Karsen *et al.*, 1983; Hilhorst, 1995). Por el contrario, tanto el ABA producido por tejidos maternos como el aplicado exógenamente, no es efectivo para inducir la dormición. Esto hecho implica que el propio embrión controla el establecimiento de este estado (Finch-Savage y Leubner Metzger, 2006). En paralelo con su rol como inductor de la dormición, la síntesis y acumulación de ABA es importante también por estimular en las semillas los procesos de acumulación de reservas y de adquisición de la tolerancia a la desecación (Nambara *et al.*, 2010).

Sin embargo, el ABA no es el único responsable en establecer y mantener la dormición. En efecto, el establecimiento de la dormición es resultado del balance del ABA y de las GAs. Las GAs son una familia de hormonas diterpenoides que regulan el desarrollo y la germinación de las semillas, y otros procesos ligados al crecimiento de las plantas como la expansión foliar, la elongación de los tallos y la floración (Sawada *et al.*, 2008). Durante el desarrollo de las semillas, la biosíntesis de GAs se encuentra regulada negativamente observándose una acumulación mínima de formas de GAs bioactivas y

de sus precursores (Yamaguchi *et al.*, 2001). Sin embargo, aun estas concentraciones reducidas de GAs ejercen un efecto fisiológico concreto, ya que su carencia, debido a la aplicación de un inhibidor químico de la síntesis de GAs, produce semillas con un tiempo de dormición mayor que los controles no tratados (Steinbach *et al.*, 1997). En conjunto, estos resultados exhiben que la imposición y el mantenimiento de la dormición es consecuencia de un balance entre inhibidores (ABA) y promotores (GAs) de la germinación lo que determinará el establecimiento y una dinámica propia de salida desde la dormición.

Análisis moleculares permitieron corroborar que la modulación de la actividad del ABA y las GAs en tiempo y espacio se basa en la acción de factores de transcripción del tipo B3 como el *FUS3*. Este factor de transcripción fue señalado como un regulador positivo de la acumulación del ABA y negativo para las GAs durante el desarrollo de las semillas (Nambara *et al.*, 2000; Holdsworth *et al.*, 2008). También la sensibilidad al ABA y a las GAs se halla regulada antagónicamente por factores de transcripción del tipo B3 (Giraudat *et al.*, 1992, citado por Yamaguchi *et al.*, 2008). En efecto, los genes ortólogos ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) y VIVIPAROUS 1 (VP1) activan la transcripción de genes ABA-dependientes, como la represión de la transcripción de los genes GA-dependientes (Yamaguchi *et al.*, 2008).

En semillas maduras ya dispersadas, la regulación de la dormición continúa bajo control de estas fitohormonas. En efecto, la regulación del nivel de dormición es producto de un balance dinámico entre los procesos de síntesis y degradación del ABA y de las GAs, donde la salida de la dormición se asocia frecuentemente con un incremento en la concentración de GAs (Sawada *et al.*, 2008), en la sensibilidad a las GAs (Benech-Arnold *et al.*, 2003), una reducción del contenido de ABA (Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Millar *et al.*, 2006) y una pérdida en la sensibilidad a este compuesto (Corbineau *et al.*, 2002; Gualano *et al.*, 2007). En cambio, bajo condiciones ambientales que no estimulan la salida de la dormición, Debeaujeon y Koorneef, (2000) y Ali-Rachedi *et al.* (2004) señalaron que el mecanismo involucrado en el mantenimiento de la dormición primaria requiere de la síntesis de ABA *de novo*. Incrementos en el contenido de ABA *de novo* fueron descritos además por Benech-Arnold *et al.* (2006) y Grappin *et al.* (2000) en semillas de *Hordeum vulgare* (L.) y *Nicotiana plumbaginifolia* (Viv.) respectivamente. Finch-Savage y Leubner-Metzger (2006) propusieron un modelo que describe la regulación hormonal del estado de dormición (*i.e.* relación ABA/GAs) en respuesta a la percepción de las condiciones ambientales que experimenten las semillas (Figura 1.1).

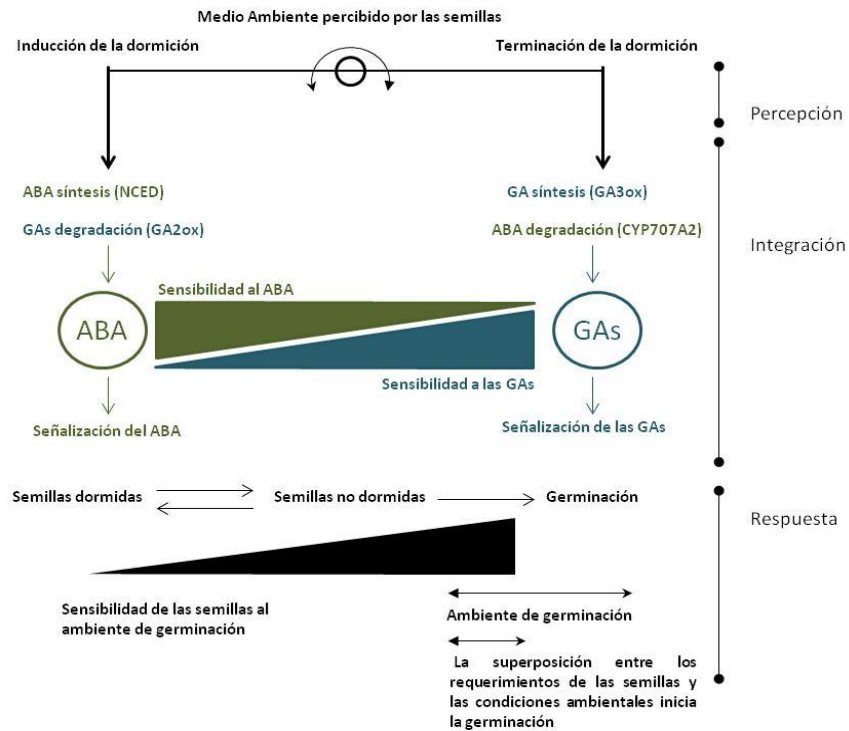


Figura 1.1: Modelo de regulación hormonal de la dormición y germinación por ABA y GA en repuesta a la temperatura de incubación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006)

Metabolismo y red de señalización del ABA y las GAs

Metabolismo del ABA

El ABA pertenece a una clase de compuestos denominados isoterpenoides. El ABA es sintetizado a partir de un carotenoide C40. Los carotenoides son uno de los isoterpenoides ubicados en los plastidos. Es allí donde ocurren los primeros pasos en la síntesis del ABA, mientras que las transformaciones posteriores ocurren en el citosol (Figura 1.2) (Nambara y Marion-Poll, 2005). El primer compuesto dentro de la ruta de síntesis es la zeaxantina. La zeaxantina sufre dos sucesivas oxidaciones catalizadas por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP), donde se transforma en violaxantina. En *A. thaliana*, esta enzima está codificada por el gen *AtABA1*. Violaxantina es finalmente convertido en un precursor de C15 denominado xantoxina, mediante la acción de la 9cis epoxicaroteno dioxigenasa (NCED). En *A. thaliana* los miembros de la familia génica *AtNCED* 2-3-5-6 y 9 fueron propuestos como pasos reguladores claves en la síntesis del ABA (Schwartz *et al.*, 2003). En el citosol la xantoxina es posteriormente convertida en aldehído abscísico, por la acción de una enzima de cadena corta hidroxigenasa/reductasa, la SDR, codificada en *Arabidopsis* por el gen *AtABA2* y luego en ABA por la enzima abscísico aldehído oxidasa. En *Arabidopsis* este último paso está codificado por el gen *AAO3* (Seo *et al.*, 2006). La reducción del contenido de ABA es ejercida por dos mecanismos diferentes. Estos mecanismos son: el catabolismo y la inactivación del ABA (Seiler *et al.*, 2011). El catabolismo del ABA es consecuencia de tres tipos diferentes de hidroxilaciones. Sin embargo, la ocurrida en la posición C-8 es la predominante en varios procesos fisiológicos. Una enzima oxigenasa del tipo P450, denominada ABA 8'-hidroxilasa, cataliza este proceso (Umezawa *et al.*, 2006). La ABA 8'-hidroxilasa convierte al ABA en ácido faseico (PA) siendo posteriormente catabolizado en ácido dihidroxifaseico (DPA). La ABA 8'-hidroxilasa está codificada

por miembros de una familia de genes *CYP707A*. Los genes *CYP707A1-CYP707A4* codifican para esta enzima, siendo los niveles de expresión de *CYP707A2* responsables de la degradación rápida del ABA durante la imbibición de semillas de *Arabidopsis* (Nambara y Marion-Poll, 2005). Otra manera de inactivar el ABA involucra su conjugación con glucosa. La enzima ABA glucosiltransferasa cataliza este proceso que conlleva la formación de una forma inactiva de esta hormona denominada ABA glucosil-éster (ABA-GE) (Lee *et al.*, 2006).

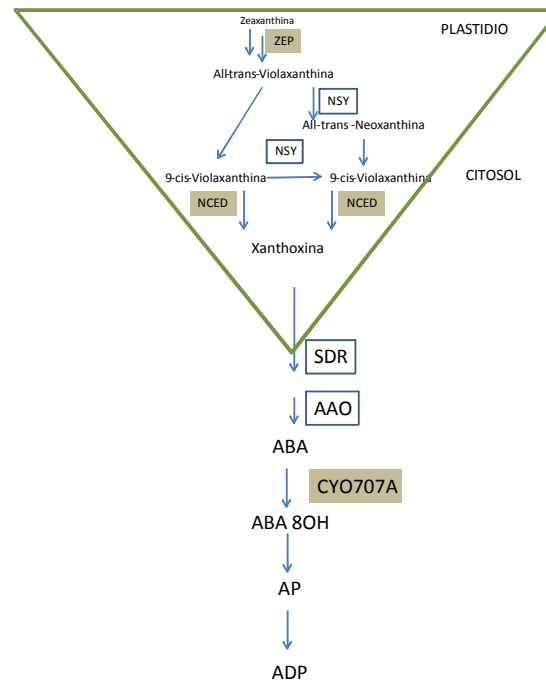


Figura 1.2. Metabolismo del ABA. Cada caja representa a una enzima. Las cajas con fondo canela representan a las enzimas con una función regulatoria en semillas. Adaptado de Nambara *et al.* (2010).

Señalización del ABA

Entre otros autores Umezawa *et al.* (2011) y Nambara *et al.* (2010) revisaron los avances recientes en la señalización de esta hormona. En la recepción de la señal del ABA están involucradas cinco proteínas. Entre ellas, PYR1/PYL/RCAR (integrantes de la familia START) ejercen un rol prominente en la respuestas al ABA en las semillas al regular la actividad de la PP2C (proteína fosfatasa 2C). Dentro de la familia de las PP2C, ABI1 y ABI2 (ABA insensible 1 y 2, respectivamente) se posicionan como los actores principales en la regulación de esta respuesta. La respuesta al ABA puede ser descripta brevemente de la siguiente manera, PYR/PYL/RCAR, inhiben la actividad de las enzimas fosfatasas PP2C (Figura 1.3). En ausencia de ABA, la PP2C inhibe la fosforilación de una familia de quinasas (SnRK2). SnRK2, es un regulador positivo de la señalización de este regulador de crecimiento. SnRK2 activa a los denominados elementos responsivos al ABA (ABRE's) y de este modo componentes de la señalización ubicados corriente abajo (*e.g.* ABI5) permanecen inactivos. Los ABRE's, son componentes de la señalización del ABA que contienen una matriz común de nucleótidos ACGT, siendo esta matriz reconocida por factores de transcripción del tipo bZIP. Por el contrario, la presencia de ABA permite que las proteínas receptoras PYR/PYL/RCAR *secuestren* la PP2C y de este modo se permite la activación de las

quinasas que activarán a los factores de transcripción que iniciarán la expresión de genes responsivos al ABA.

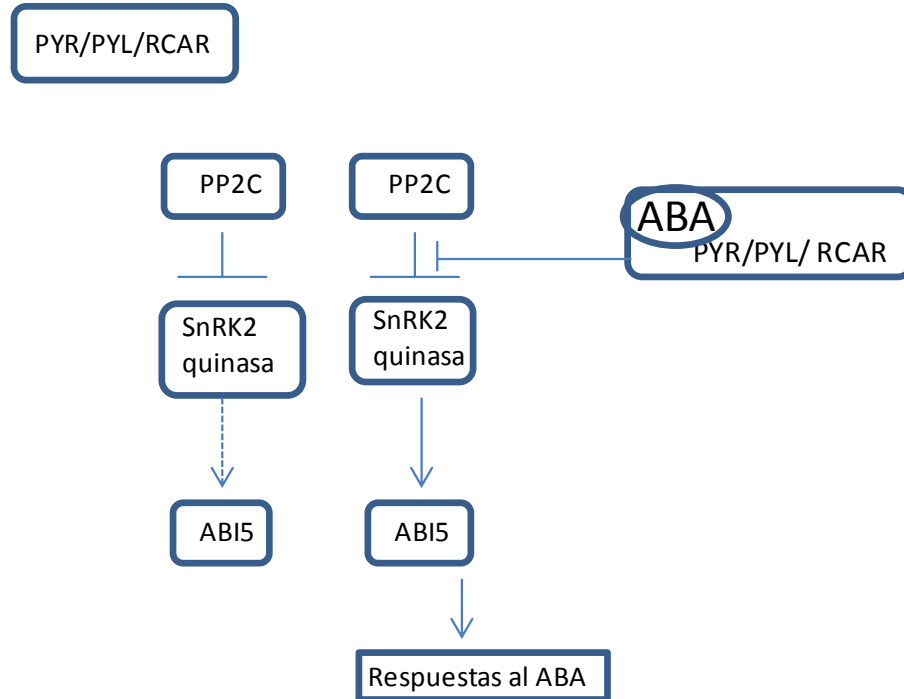


Figura 1.3 Componentes de señalización del ABA (Adaptado de Nambara *et al.*, (2010).

En efecto, ABI3, ABI4 y ABI5 son factores de transcripción que confieren las respuestas de las semillas al ABA. ABI5, es un factor de transcripción bZIP que se une con un elemento ABRE y activa la transcripción de genes mediada por el ABA. En cambio, ABI3 se une con elementos RY y ABI4 se une con el elemento acoplado 1 (CE1) los cuales funcionan junto con los elementos ABRE para promover la transcripción de genes mediada por ABA. ABI3 y 5 interactúan entre sí. Por el contrario, no hay interacción entre ABI4 y ABI5.

Metabolismo de las GAs.

Las GAs son ácidos diterpenos tetracíclicos naturales cuya estructura está formada por un anillo *ent*-giberelano (Yamaguchi, 2008). La biosíntesis de GAs se divide en plantas superiores en tres etapas: síntesis de *ent*-kaureno a partir del geranilgeranildifosfato (GGDP), conversión del *ent*-kaureno a GA₁₂ y síntesis de GAs de 19 y 20 carbonos a partir del GA₁₂ (Yamauchi *et al.*, 2007) (Figura 1.4). La primera parte de la biosíntesis ocurre en los plástidos y esta catalizada por la acción de terpeno ciclasas (TPS). Comienza con la ciclación del GGDP, proceso que tiene lugar en dos pasos, el primero catalizado por la enzima *ent*-copalildifosfato sintasa (CPS) dando como producto *ent*-copalil difosfato (CDP), y el segundo paso catalizado por la enzima *ent*-kaureno sintasa (KS) tiene como producto el *ent*-kaureno (KO). Los genes que codifican para CPS fueron aislados en algunas especies. Entre ellas: *Arabidopsis* el gen *AtCPS* (GA1) (Sun y Kamiya, 1994), en arroz el gen *OSCycl1* (Prisic *et al.*, 2004) y en maíz los genes *An1* (Bensen *et al.*, 1995) y *An2* (Harris *et al.*, 2005). Los genes que codifican para KS fueron aislados entre otras especies en: *Arabidopsis AtKS* (GA2, Yamaguchi *et al.*, 1998), calabaza *CmKS* (Yamaguchi *et al.*, 1996).

La segunda etapa de la síntesis tiene lugar en el retículo endoplasmático y está catalizada por monooxigenasas del tipo citocromo P450. El *ent*-kaureno es oxidado a *ent*-kaurenol, a *ent*-kaurenal y finalmente a ácido *ent*-kaurenoico por las enzima *ent*-

kaureno oxidasa (KO). Posteriormente el ácido *ent*-kaurenoico es oxidado en tres oportunidades, en reacciones catalizadas por la enzima *ent*-kaurenoico oxidasa (KAO) para producir GA₁₂. Compuestos que interactúan con el P450 como el Paclobutrazol y el Tetcyclasis inhiben la actividad de estas enzimas (Rademacher, 2000). Se han clonado genes que codifican para KO en *Arabidopsis* (Helliwell *et al.*, 1999) y en arroz (Itoh *et al.*, 2004). Los genes que codifican para KAO fueron aislados en *Arabidopsis* AtKAO1 y AtKAO2 (Helliwell *et al.*, 2001) y en arroz (Sakamoto *et al.*, 2004). La tercera parte de la síntesis, ocurre en el citoplasma de las células y está catalizado por enzimas dioxigenasas dependientes del 2-oxoglutarato y FE²⁺. El proceso posterior a la GA₁₂ puede variar de acuerdo con la especie presentando dos rutas diferentes. En la ruta de la no hidroxilación temprana del C-13, el C-20 de la GA₁₂, es oxidado dos veces dando lugar a GA₁₅ y GA₂₄. La eliminación del C-20 de la GA₂₄ origina la GA₉, primera GA C-19, siendo ambos pasos catalizados por la GA 20-oxidasa. La posterior incorporación de un grupo hidroxilo en posición 3β en la GA₉ produce GA₄ primer compuesto con actividad biológica siendo este proceso es catalizado por la enzima GA 3-oxidasa. En la ruta de la hidroxilación temprana del C-13, el GA₁₂ es oxidado en el C-13 por la enzima GA 13-oxidasa transformándose en GA₅₃. Posteriormente en el C-20 es oxidado por la GA 20-oxidasa dando GA₄₄ y GA₁₉. A continuación se elimina el C-20 de la GA₁₉ sintetizándose GA₂₀, primera GA C-19 de la ruta, La posterior incorporación de un grupo hidroxilo en posición 3β en la GA₉ produce GA₁ compuesto con actividad biológica siendo este proceso catalizado por la enzima GA 3-oxidasa. Rademacher (2000), señaló que compuestos que mimetizan la estructura de las monooxigenasas 2 oxoglutarato dependientes (*e.g.* Prohexadione-Ca y el Trinexapac-ethyl) actúan como inhibidores de estas enzimas involucradas en la biosíntesis de GAs.

Las GAs de C-19 (GAs 20, 1, 19, 4) se desactivan o pierden su actividad biológica mediante la β hidroxilación en C-2 a través de la acción de GA 2-oxidasa siendo este proceso clave en la regulación de los niveles de GAs con acción biológica. De este modo la GA₉, GA₄, GA₂₀ y GA₁ se transforman en GA₅₄, GA₃₄, GA₂₉ y GA₈ respectivamente. Los genes que codifican para dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato GA20-oxidasa y GA3 oxidasa están encargados de la síntesis de GA y los genes para GA2-oxidasa están involucrados en su inactivación. La familia de la GA 20-(GA20ox) oxidasa está formada por un número variable de genes de acuerdo con la especie. En *Arabidopsis* hay cinco genes GA20ox (Phillips *et al.*, 1995), en arroz hay cuatro (Sakamoto *et al.*, 2004) y dos en el tabaco (Tanaka-Ueguchi *et al.*, 1998). Los genes que codifican para GA3-oxidasa fueron clonados en varias especies. En *Arabidopsis* se han aislado cuatro genes GA3ox (Yamaguchi *et al.*, 1998), en arveja (Martin *et al.*, 1997) y arroz (Itoh *et al.*, 2001) fueron aislados 2 genes y en tabaco fue aislado un gen GA3ox (Tanaka-Ueguchi *et al.*, 1998, Itoh *et al.*, 1999). El estudio de la función de los integrantes de la familia de GA3ox reveló que existe una expresión diferencial de cada miembro de la familia siendo *AtGA3ox1* y *AtGA3ox2* claves en el incremento del contenido de GAs (Yamauchi *et al.*, 2007). Fueron clonados GA 2-oxidasa (GA2ox) en varias especies. Por ejemplo, en *Arabidopsis* hay 8 genes (Yamaguchi *et al.*, 2008), en arroz hay 6 genes (Sakamoto *et al.*, 2004), en tomate y arveja 5 genes (Serrani *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 1997). El gen *AtGA2ox* es el miembro más importante en la promoción de la germinación en semillas tratadas con luz (Yamaguchi *et al.*, 2008)

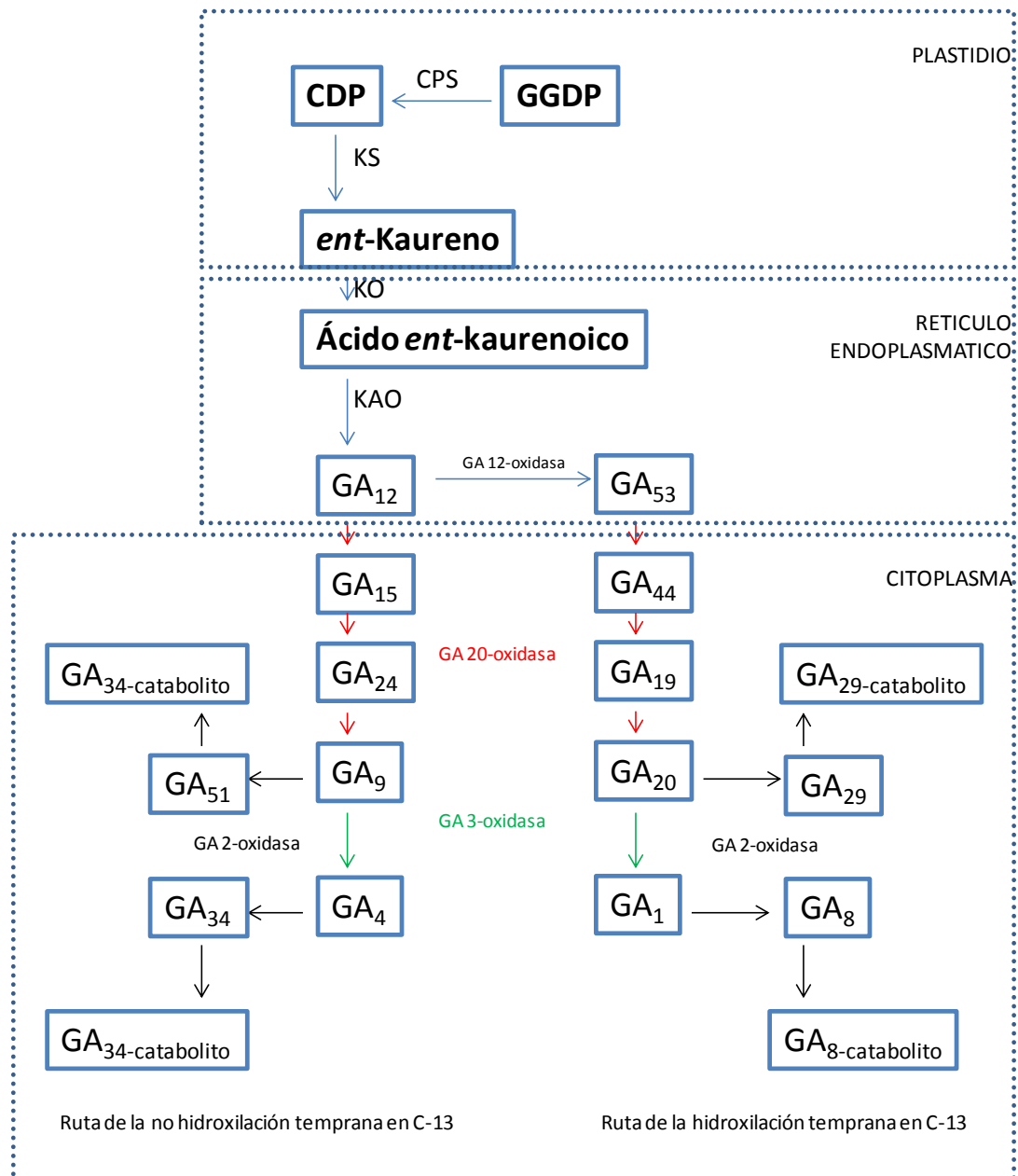


Figura 1.4 Esquema de la ruta del metabolismo de las giberelinas. Paso de CDP a GGDP en el plastidio. Paso de *ent*-kaureno a GA₁₂ en el Retículo endoplasmático. Síntesis de GAs a partir de GA₁₂ en el citoplasma.

Señalización de GAs

La señalización de las GAs está regulada negativamente por la acción de un grupo de proteínas nucleares denominadas DELLA. Estas proteínas son una subfamilia perteneciente a la familia de factores de transcripción llamada GRAS. El nombre DELLA, obedece a una secuencia de aminoácidos conservada de la proteína (D=Asp., E= Glu., L= Leu., L= Leu., A= Ala.) (Steber, 2008). La ruta de señalización de las GAs fue descrita tanto para arroz como para *Arabidopsis*. En arroz hay solamente una proteína DELLA (SLR1), en cambio en *A. thaliana* se hallaron cinco DELLAs: GA-INSENSITIVE (GAI) (insensible a GA), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) (represor de GA1-3), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2 y RGL3. Sin embargo, la inhibición de la germinación solamente recae en RGL2 (Piskurewicz *et al.*, 2008). El modelo de acción propuesto para la promoción de procesos en respuesta a las GAs (*i.e.* germinación) requiere de la destrucción de RGL2. Inicialmente la señal de las GAs es percibida por

un receptor de GA, GA-INSENSITIVE DWARF1 (GID1). La unión de la GA bioactiva con GID1 promueve la interacción entre GID1 y el dominio DELLA de la proteína DELLA. Posteriormente y como resultado de la unión DELLA-GID1, se incrementa la afinidad entre DELLA y un complejo ubiquitina-ligasa (SCF E3) que termina con la destrucción de la DELLA (*e.g.* RGL2) por el proteosoma 26S. La destrucción de RGL2 permite en consecuencia la transcripción de genes en respuesta a la señal de las GAs (Achard *et al.*, 2008). Por otro lado, RGL2 está involucrado en la represión de la germinación al estimular la síntesis de ABA y la actividad de ABI5 y ABI3.

Etileno y otras hormonas involucradas en la terminación de la dormición

El etileno es sintetizado a partir de la metionina en el denominado ciclo de Yang (Matilla, 2000). El último paso de su síntesis es catalizado por la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa (ACO), siendo la actividad de esta enzima fundamental en regular la tasa de formación de este compuesto (Linkies *et al.*, 2009). Una vez sintetizado el etileno se une a su receptor. El primer receptor identificado fue el material mutante de *Arabidopsis etr 1* (etileno triple response 1) un regulador negativo de la señalización del etileno (Matilla y Matilla-Vázquez, 2008). Una vez que ETR1 se une al etileno, este receptor se inactiva y torna posteriormente inactivo a CTR1 (constitutive triple response 1), otro regulador negativo de la señalización de esta hormona. El CTR1 inactivo, permite la transcripción de los genes que codifican para EIN2 (etileno insensible 2), regulador positivo, y otros elementos involucrados en la señalización como EIN3, EIL1 y EREBPs (factores de transcripción que se unen a elementos responsivos al etileno) /ERFs, que activan la transcripción de genes que responden al etileno. El etileno interviene en la ruptura de la dormición al interferir en la señalización del ABA (Kucera *et al.*, 2005). En efecto, Linkies *et al.* (2009) reportaron que el etileno contrarresta los efectos del ABA al interferir con su señalización sin afectar especialmente la concentración de esta hormona. Fue observado que en semillas mutantes, resistentes al etileno (*etr1*), insensibles al etileno (*ein2*) o con mayor respuesta al ABA (*era*), un nivel de dormición elevado asociado especialmente con una mayor sensibilidad al ABA (Chiwocha *et al.*, 2005). Por el contrario, el mutante *ctr 1* (respuesta triple constitutiva) y semillas del biotipo salvaje tratadas con el precursor de etileno ACC (1 aminociclopropano-1- ácido carboxílico) muestran una reducida sensibilidad al ABA (Finkelstein *et al.*, 2008).

Los brasinoesteroides (BRs) son fitohormonas que participan en la promoción de algunos procesos vegetales que incluyen la germinación de semillas. Finkelstein *et al.* (2008) señalaron que si bien las semillas de *Arabidopsis* mutantes, carentes o insensibles a los BRs, germinan correctamente se caracterizan por ser más sensibles a la inhibición ejercida por el ABA que las del biotipo salvaje. Los autores propusieron que esta mutación reduce el potencial de crecimiento del embrión (*i.e.* la capacidad de sobreponerse a restricciones físicas que impiden su crecimiento). Steber y McCourt (2001), reportaron que la aplicación de los BRs, epibrasinolia y brasinolida, permitieron la germinación de los mutantes carentes (*ga 1-3*) e insensibles a las GAs (*sleepy 1*). Sin embargo, los resultados provistos por Leubner-Metzger (2001) señalaron que las rutas de acción de ambas hormonas son independientes, y aunque ambas hormonas promueven la ruptura del endosperma de semillas de tabaco en la oscuridad, solamente las GAs inducen la actividad de la β -1,3 glucanasa, la enzima requerida para la ruptura del endosperma. De este modo, el autor concluye que la acción principal de los BRs radica en el incremento del potencial de crecimiento del embrión de manera independiente a las GAs. Por su parte el rol de los jasmonatos (JAs) fue recientemente

revisado por Linkies y Leubner-Metzger (2012). Los autores señalan que esta hormona participa en las respuestas de la planta al estrés, inhibiendo el crecimiento y la germinación.

II. Factores ambientales

Factores del ambiente como la temperatura y la disponibilidad hídrica actúan modulando los cambios en el nivel de dormición de las poblaciones de semillas (Batlla *et al.*, 2005). La temperatura del suelo tiene un papel principal en la modificación del nivel de dormición de las semillas (Allen *et al.*, 2008). En efecto, las bajas temperaturas del suelo durante el invierno alivian la dormición de las semillas de especies anuales de emergencia primavera-estival, determinando un mínimo de dormición a la entrada de la primavera y consecuentemente, la germinación bajo condiciones térmicas más favorables para el crecimiento de las plántulas (Baskin y Baskin, 1985). En la medida que avanza la primavera, el incremento de la temperatura del suelo re-induce la entrada en dormición secundaria de la población de semillas, evitando la germinación en épocas menos favorables (Kruk y Benech-Arnold, 2000; Bouwmeester y Karsen, 1993). La percepción de las señales ambientales como la temperatura, modula la expresión de genes que participan de la síntesis y degradación de hormonas alterando la relación ABA/GAs (Footitt *et al.*, 2011). Yamauchi *et al.* (2004) y Yamaguchi y Kamiya (2002), reportaron que la exposición a bajas temperaturas, en especies a las que este tratamiento reduce el nivel de dormición, incrementó la síntesis de GAs. Más recientemente, Cadman *et al.* (2006) hallaron que la influencia de la temperatura de post-madurado sobre el nivel de dormición parecería estar regulada a nivel de la transcripción de los genes que codifican para enzimas del catabolismo y la síntesis del ABA o las GAs, respectivamente.

Las modificaciones señaladas en el nivel de dormición, son observables a través de cambios en el rango térmico y de potenciales hídricos dentro del cual la germinación puede ocurrir. Para el caso de la temperatura, Probert (2000) señaló que cuando el nivel de dormición es muy alto el rango térmico dentro del cual la germinación puede ocurrir es estrecho. Por el contrario, cuando el nivel de dormición disminuye, el rango de temperaturas dentro del cual la germinación ocurre se amplía progresivamente. Conjuntamente con el incremento del rango térmico permisivo para la germinación, la reducción del nivel de dormición está acompañado de una mejora en la tolerancia de las semillas para germinar en potenciales agua más negativos (Bradford, 2002). En efecto, estos cambios pueden ser cuantitativamente descritos por medio de la utilización del modelo de hidrotiempo (Gummerson, 1986). Uno de los parámetros emergentes de dicho modelo, el potencial agua base (ψ_b), tiene importantes implicancias fisiológicas, ya que su valor está relacionado con la capacidad del embrión para superar las restricciones a su crecimiento, impuestas por el embrión en sí mismo o por los tejidos que lo rodean. Bradford (2005), observó que la salida de la dormición en semillas, se asocia con una progresiva disminución del potencial agua base promedio de la población ($\psi_b(50)$) (el potencial agua por debajo del cual la mitad de la población no germina). En forma contraria, la entrada en dormición está acompañada de un progresivo aumento del $\psi_b(50)$ (Bradford, 1996; Christensen *et al.*, 1996, 1998). De un modo semejante, la incubación de semillas en soluciones con reguladores de crecimiento que mantienen la dormición, o promueven la germinación (ABA y GAs, respectivamente) ocasionan un desplazamiento similar del $\psi_b(50)$ hacia valores más positivos o más negativos respectivamente (Ni y Bradford, 1993).

Una vez que el nivel de dormición de la población de semillas se reduce, ciertas especies todavía requieren de la exposición de las semillas a factores ambientales que actúan como terminadores de la dormición (*i.e.* nitratos, luz y temperaturas alternadas) para dar paso luego al proceso de germinación (Benech-Arnold *et al.*, 2000).

II.1) Factores externos terminadores de la dormición: nitratos, luz y temperaturas alternadas.

Nitratos

El papel de los nitratos como factor terminador de la dormición fue informado para varias especies no domesticadas. Hilhorst y Karsen (1992), propusieron que la acción fisiológica de los nitratos estaría relacionada con la biosíntesis de GAs en estrecha relación con la luz roja. En cambio, Alboresi *et al.* (2005), sugirieron que la acción de los nitratos sería la de una molécula señalizadora y que podría estar interactuando con las GAs y/o el ABA. Más recientemente Matakias *et al.* (2009), reportaron una reducción del contenido de ABA tras la aplicación de nitratos en semillas de *Arabidopsis*. Esta reducción fue atribuida a un incremento la expresión de *CYP707A2*, el gen que cumple un papel clave en la degradación del ABA. Estos autores señalaron que el sentido ecológico del requerimiento de nitratos reside en que bajo condiciones limitantes de nitrógeno no se permite la terminación de la dormición de la población de semillas, eludiendo de esta manera, la germinación en condiciones edáficas poco favorables para el establecimiento de las plantas.

Luz

La luz roja termina la dormición en semillas de muchas especies (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Este tipo de radiación es percibida por un pigmento llamado fitocromo. El fitocromo es una cromoproteína compuesta por una apoproteína y un cromóforo. El fitocromo se sintetiza bajo la forma que absorbe a la luz roja (Pr) y cuando es expuesto a este tipo de luz, altera su conformación hacia la forma que absorbe luz del rojo lejano (Pfr), siendo esta última la que estimula respuestas activas biológicamente. En la familia de las Brasicáceas, la cual incluye a *Arabidopsis*, la apoproteína está codificada por cinco genes diferentes (PHYA-PHYE) cada uno de ellos responsable de mediar en alguno de los modos de acción del fitocromo. La conversión entre ambas formas del fitocromo está regulada por la composición espectral de la luz (relación rojo/ rojo lejano), que determina distintas relaciones entre las cantidades presentes de Pr y Pfr. Además, el Pfr puede también convertirse a Pr en oscuridad en un proceso denominado reversión. La terminación de la dormición, ocurre cuando la cantidad de Pfr/Ptotal establecida se encuentra por encima de un valor umbral característico de cada especie (Casal y Sánchez, 1998). Una característica importante de los espectros de absorción para ambas formas del fitocromo es la superposición de los mismos. Esto determina que la cantidad de Pfr establecida luego de una exposición saturante de rojo alcance valores cercanos al 86% de Pfr, mientras que luego de una exposición de rojo lejano la cantidad de Pfr obtenida sea de 3%. Existen tres modos de respuesta al fitocromo. La primera de estas, mediada por el fitocromo A, se denomina VLFR (Very Low Fluence Response). Este modo de acción, se expresa con exposiciones a muy bajos flujos de fotones que establecen porcentajes de Pfr/Ptotal entre 10^{-4} y 10^{-2} . Este tipo de respuesta, no reversible, estimula la terminación de la

dormición en algunas especies de malezas ante brevísimas exposiciones a la luz (Scopel *et al.*, 1991). El segundo tipo de respuestas son las LFR (Low Fluence Response). Esta respuesta mediada por el fitocromo B, requiere de exposiciones a bajos flujos de fotones, que establecen porcentajes de Pfr/Ptotal entre 1 y 86 (Cone *et al.*, 1985). Este modo de acción está caracterizado por presentar reversibilidad y cumplir con la ley de reciprocidad (Neff *et al.*, 2000). Un último tipo de respuesta, también mediada por el fitocromo A, son las HIR (High Irradiance Response). Shinomura *et al.* (2000), señalaron que las HIR se manifiestan con exposiciones prolongadas a luz con altos flujos de fotones (PFD) siendo los más efectivos aquellos con longitudes de onda de 710-720nm o 340-500nm. Este tipo de respuesta se caracterizan por no mostrar reciprocidad (Hartmann, 1966) e inhibir la germinación (Wall y Johnson, 1983).

Terminación de la dormición por exposición de semillas a la luz.

En algunas especies la terminación de la dormición está bajo el control del fitocromo (*e.g.* *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis*). Una vez que las semillas son expuestas a la luz, un conjunto de procesos son activados siendo posible observarlos a diferentes niveles de organización. En efecto, la terminación de la dormición mediada por la respuesta del tipo LFR (de Miguel *et al.*, 2000; Carpita *et al.*, 1979) o del tipo VLFR (Arana *et al.*, 2007) obedece a cambios en la relación entre las GAs y el ABA expresados tanto a nivel del contenido como de la sensibilidad a estas hormonas. Fue observado que luego de ser expuestas a la luz, el fitocromo B incrementa la expresión de *AtGA3OX* resultando en un incremento de GA₄ (Yamaguchi, 2008; Sawada *et al.*, 2008), mientras que Yang *et al.* (1995) y Arana *et al.* (2006) observaron una mayor sensibilidad a las GAs aplicadas exógenamente. Por otro lado, la síntesis y la degradación del ABA también son afectadas por el fitocromo. En efecto, Seo *et al.* (2006) observaron que la expresión del gen de biosíntesis del ABA *AtNCED6* fue suprimida y por el contrario la expresión del gen de degradación *CYP707A2* fue regulada positivamente.

Temperaturas alternadas

Las temperaturas alternadas terminan con la dormición en numerosas poblaciones de malezas y otras especies no domesticadas (Probert *et al.*, 1986; Probert., 1992). En efecto, en muchas especies la germinación no ocurre, o se reduce severamente, cuando las semillas son incubadas a temperatura constante (Probert, 2000). Los requerimientos de temperaturas alternadas se encuentran distribuidos en muchas familias botánicas procedentes tanto de ambientes terrestres como acuáticos (Steinbauer y Grigsby, 1957; Thompson y Grime, 1983). Para semillas enterradas, las temperaturas alternadas se constituyen en una señal ambiental importante para la terminación de la dormición, ya que por debajo de los primeros milímetros de profundidad la influencia del ambiente lumínico es nula (Pons, 2000; Bliss y Smith, 1985; Tester y Morris, 1987). En contraste, variaciones en la amplitud térmica del suelo son registradas todavía a varios centímetros de profundidad (Van Esso *et al.*, 1986). Thompson y Grime (1983), propusieron que el sentido ecológico de este requerimiento radica en la posibilidad de detectar la profundidad de entierro de las semillas y la presencia de brechas en el dosel vegetal. En ambientes acuáticos, las semillas ubicadas sobre el lecho perciben una menor fluctuación térmica en la medida que la corriente de agua presente una mayor altura, no viendo satisfecho en esas circunstancias su requerimiento de alternancia de temperaturas para terminar la dormición.

Roberts y Totterdell (1981) identificaron nueve características del ciclo de temperaturas alternadas, siendo cada una probablemente responsable del efecto terminador sobre la dormición. Los autores propusieron al número de ciclos, su amplitud, el valor de la temperatura máxima, el valor de la temperatura mínima, el periodo de tiempo en que las semillas se expusieron a la máxima o mínima de las temperaturas que forman el ciclo de alternancia, la tasa de incremento de temperatura o de enfriamiento y el momento dentro del ciclo con respecto a la imbibición. No obstante, al presente existe consenso que la respuesta a las temperaturas alternadas se incrementa sobre las siguientes características del ciclo de alternancia: I) a partir de un mayor rango o amplitud térmica (Ekstam y Forseby, 1999; Roberts y Totterdell, 1981; Thompson y Grime, 1983; Totterdell y Roberts, 1980), II) la respuesta para una determinada amplitud, es mayor cuando se incrementa la temperatura media del ciclo diario y III) la acumulación de ciclos con características estimulantes para terminar con la dormición presenta un efecto aditivo sobre la población de semillas, resultando en la terminación de la dormición de una fracción complementaria de la misma (Benech-Arnold *et al.*, 1990a, Roberts y Totterdell, 1981; Probert *et al.*, 1987). No obstante, el número de ciclos necesarios para obtener la máxima respuesta, varía con la especie en cuestión y el grado de sensibilidad de cada especie a la alternancia de temperaturas (Ekstam y Forseby, 1999; Benech-Arnold *et al.*, 1990a). La sensibilidad a la alternancia de temperaturas está influenciada además por el nivel de dormición de la población de semillas (Benech-Arnold *et al.*, 2000). Benech-Arnold *et al.* (1990b), reportaron que el número de ciclos necesarios y la amplitud requerida se redujo luego de un tiempo de permanencia en el suelo durante el invierno. Más recientemente Batlla *et al.* (2003), informaron una reducción de los requerimientos (*e.g.* menor número de ciclos-dosis) de temperaturas alternadas en la medida en que las semillas de *Polygonum aviculare* pierden su dormición durante la estratificación. Por lo tanto, la sensibilidad a las temperaturas alternadas se incrementa cuando la dormición se alivia y decrece cuando el nivel de dormición es alto (por ejemplo: semillas recientemente dispersadas). Sin embargo, y contrariamente a lo esperado tomando en cuenta la cantidad de especies que requieren de este estímulo, hasta el presente no son conocidos en profundidad los procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares promovidos por la exposición de las semillas a este estímulo (Hilhorst, 2008; Hilhorst *et al.*, 2010). En cambio, para semillas en desarrollo, fue reportado que la exposición a temperaturas alternadas produjo una menor sensibilidad al ABA (Benech-Arnold *et al.*, 1995) y una reducción en la sensibilidad al ABA y un incremento en la sensibilidad a GAs exógenas (Mendiondo, 2009).

La terminación de la dormición en semillas expuestas a la alternancia de temperaturas: Posibles mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares involucrados en esta respuesta.

El punto de partida seleccionado para dilucidar el conjunto de procesos intervinientes en la terminación de la dormición por efecto de las temperaturas alternadas, fue el de investigar si una vez percibidas, las semillas adquirirían la capacidad de germinar bajo potenciales hídricos más negativos. La observación de un incremento en la germinación a potenciales osmóticos reducidos, analizada dentro del contexto del modelo hidrotiempo se reflejaría en una reducción del $\psi_b(50)$ de las semillas expuestas a regímenes de temperaturas alternadas. La reducción del valor de este parámetro tiene un fundamento hormonal basado en una reducción de la relación ABA/GAs, de una mayor sensibilidad a las GAs y de una reducción en la sensibilidad al ABA. En esa misma línea de razonamiento, la dilucidación de las bases moleculares de la respuesta a las

temperaturas alternadas incluye el análisis de la expresión de genes que codifican para enzimas de la síntesis y/o degradación del ABA (*e.g. NCED, CYP707A2*) o de las GAs (*e.g. GA-3ox*).

OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este trabajo fue dilucidar los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares implicados en la terminación de la dormición en semillas expuestas a las temperaturas alternadas.

Los objetivos particulares de esta tesis son:

- I. Determinar si la incubación de semillas en un régimen de temperaturas alternadas reduce el potencial agua base de la población. Tal reducción denotaría un efecto de las temperaturas alternadas sobre el balance de fuerzas entre el potencial de crecimiento del embrión y la resistencia ejercida por los tejidos que lo rodean.
- II. Determinar si la incubación bajo temperaturas alternadas incrementa el contenido endógeno de GAs en relación con lo observado bajo temperaturas de incubación constantes.
- III. Cuantificar si el contenido de ABA endógeno en semillas incubadas bajo temperaturas alternadas es menor a aquel observado en semillas provenientes de un régimen de temperatura constante.
- IV. Determinar si la incubación de semillas en un régimen de temperaturas alternadas modifica la sensibilidad de las mismas a las GAs o al ABA, con respecto al que se observa por incubación en un régimen de temperaturas constantes.
- V. Determinar si la exposición a la alternancia de temperaturas regula diferencialmente la expresión de genes involucrados en el metabolismo (*i.e.* biosíntesis y degradación) y señalización del ABA y las GAs.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las hipótesis a poner a prueba son las siguientes:

- I. Las temperaturas alternadas terminan la dormición porque incrementan el potencial de crecimiento del embrión permitiendo que las semillas germinen a ψ_{agua} más negativos. Este hecho se traduce en un desplazamiento hacia valores más bajos del valor de $\psi_b(50)$ de la población como resultado de la incubación bajo un régimen de temperaturas alternadas.
- II. El desplazamiento hacia valores más bajos del valor de $\psi_b(50)$ de la población como resultado de la incubación bajo un régimen de temperaturas alternadas es el resultado de una reducción en el contenido endógeno de ABA y/o en la sensibilidad de las semillas al ABA aplicado exógenamente.
- III. El desplazamiento hacia valores más bajos del valor de $\psi_b(50)$ de la población como resultado de la incubación bajo un régimen de temperaturas alternadas es consecuencia de un incremento en el contenido endógeno de GAs y/o en la sensibilidad a las GAs aplicadas exógenamente.

- IV. La reducción del contenido endógeno de ABA durante la incubación como consecuencia de la exposición a temperaturas alternadas, es a través de la inhibición de la expresión de genes que codifican para enzimas de la biosíntesis del ABA (*e.g. NCED*) y/o incrementa la expresión de genes que codifican enzimas comprometidas con su inactivación (*e.g. CYP707A2*).
- V. La incubación de semillas bajo alternancia de temperaturas no induce la expresión de ciertos genes de la cadena de señalización del ABA (*e.g. ABI5*) resultando en una menor sensibilidad a la acción de este compuesto.
- VI. La incubación de semillas bajo alternancia de temperaturas induce la expresión de genes que codifican para algún componente de la cadena de síntesis de GAs (*e.g. GA3ox*).
- VII. La incubación de semillas bajo alternancia de temperaturas no induce la expresión de ciertos genes que regulan negativamente la señalización de GAs (*e.g. GAI, RGL2*).

CAPÍTULO 2

**LA INCUBACION BAJO UN REGIMEN DE TEMPERATURAS ALTERNADAS
REDUCE EL POTENCIAL AGUA BASE DE GERMINACION DE VARIAS
ESPECIES NO DOMESTICADAS.**

INTRODUCCIÓN

Las temperaturas alternadas terminan con la dormición en muchas especies (Thompson y Grime, 1983; Probert 1992). Numerosos estudios señalan que la incubación bajo alternancia de temperaturas incrementa la germinación en comparación a lo observado bajo temperaturas de incubación constantes (Ekstam y Forseby, 1999; Benech-Arnold *et al.*, 2000). A pesar de que los requerimientos de alternancia de temperaturas están distribuidos ampliamente, los mecanismos fisiológicos detrás de esta respuesta son conocidos pobremente (Hu *et al.*, 2012). Una primera aproximación en búsqueda de la comprensión de las bases fisiológicas donde radica la respuesta a las temperaturas alternadas, es la comparación de los parámetros que emergen de la aplicación del modelo hidrotiempo (Gummerson, 1986). Este modelo describe la germinación de semillas sobre una base poblacional y su aplicación suele ofrecer una primera explicación fisiológica acerca de las respuestas de las semillas a factores del ambiente (Iglesias-Fernández *et al.*, 2011). El modelo de hidrotiempo relaciona el tiempo a germinación de distintas fracciones de una población de semillas con la diferencia entre el potencial agua de incubación (ψ) y el valor umbral o potencial agua base (ψ_b) para que la germinación ocurra. El modelo de hidrotiempo se describe de la siguiente manera:

$$\theta_H = (\psi - \psi_b(g)) \cdot t_g \quad (1)$$

Donde $\psi_b(g)$ es el umbral o potencial agua base para la germinación de la fracción g de la población de semillas, θ_H es la constante de hidrotiempo (expresada en MPa h o MPa d; (*i.e.* el hidrotiempo requerido desde la imbibición de las semillas hasta la protrusión de la radícula) y t_g es el tiempo a germinación de la fracción g .

Debido a que el valor de θ_H es constante y el ψ está determinado por el ambiente que rodea a las semillas, las diferencias en el tiempo de germinación entre las semillas se fundamentan en la distribución del ψ_b dentro de la población (Bradford, 1990). El ψ_b en una población de semillas está distribuido en forma normal y esta distribución puede ser caracterizada por su valor medio ($\psi_b(50)$) y correspondiente desvío estándar (σ_{ψ_b}) (Bradford, 1995). La dinámica de germinación para cada Ψ puede ser descripta por la siguiente ecuación probit (Bradford, 1990).

$$\text{probit}_{(g)} = [\Psi - (\theta_H / t_g) - \Psi_b(50)] / \sigma_{\psi_b}. \quad (2)$$

Bradford (1995), describió la significancia sentido biológica del valor de cada uno de los parámetros del modelo de hidrotiempo. Brevemente, el valor de θ_H cuantifica la velocidad de germinación. La velocidad de germinación, es afectada especialmente por factores tales como: la especie evaluada y el estado fisiológico de las semillas. El valor del σ_{ψ_b} , estima la uniformidad o sincronía en la germinación dentro de una población de semillas. El valor del $\psi_b(50)$, indica la sensibilidad de las semillas al ψ . La fracción dentro de la población de semillas cuyo ψ_b sea más alto que ψ del medio de incubación no germinará. Por otro lado la fracción de la población que presente un ψ_b superior a 0 MPa, no germinará ni en agua destilada lo que es una definición funcional de dormición (Bradford, 1996). El concepto de ψ_b tiene implicancias fisiológicas evidentes. En efecto, su valor está relacionado con la capacidad del embrión para superar aquellas restricciones que se imponen sobre su crecimiento, impuestas tanto por los tejidos que lo rodean, como por la condición de incubación. Esta capacidad puede verse modificada por factores endógenos (*i.e.* el nivel de dormición de la población de semillas) o

exógenos (temperatura, luz, hormonas aplicadas exógenamente) (Ni y Bradford, 1993; Bradford, 1995). Aquellos factores que estimulan la germinación resultan en un desplazamiento del $\psi_b(50)$ hacia valores más negativos, mientras que aquellos factores que la inhiben tienden a desplazar el $\psi_b(50)$ hacia valores menos negativos. Por ejemplo, la reducción del nivel de dormición durante la post-maduración en seco o la aplicación exógena de GAs resultan en una reducción del $\psi_b(50)$ (Christensen *et al.*, 1996; Ni y Bradford, 1993). Por el contrario, la aplicación de inhibidores de la germinación como el ABA, incrementan el valor del $\psi_b(50)$ (Ni y Bradford, 1992). Del mismo modo, la inhibición de la germinación ejercida por una temperatura de incubación elevada, está acompañada por un incremento progresivo del valor del $\psi_b(50)$ (Bradford y Somasco, 1994; Kebreab y Murdoch, 1999; Alvarado y Bradford, 2002). Dentro de este marco conceptual, es posible hipotetizar que la terminación de la dormición ejercida por las temperaturas alternadas es mediada por el desplazamiento del $\psi_b(50)$ hacia valores más negativos. El objetivo de este Capítulo es obtener una descripción cuantitativa de la respuesta a la alternancia de temperaturas en varias especies no domesticadas. En particular, se pretende determinar si la incubación bajo un régimen de temperaturas alternadas cancela la dormición de las semillas a través de un desplazamiento de $\psi_b(50)$ hacia valores más negativos, en relación al valor observado a temperaturas de incubación constantes.

MATERIALES Y METODOS

Semillas

Se recolectaron semillas maduras de *Brassica campestris* (L.) y *Carduus acanthoides* (L.) durante marzo del año 2000 en la Estación Experimental del INTA Balcarce (Lat. 37° 45' S, Long 58° 15' O). Las semillas de *Cirsium vulgare* (Savi) Ten., *Cynara cardunculus* (L.) y *Sisymbrium altissimum* (L.) fueron recolectadas en el mismo sitio durante marzo de 2001. Las semillas de *Carduus acanthoides* y *Cynara cardunculus* fueron recolectadas en los alrededores de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora, (34° 48' S, 58° 31' O) durante marzo de 2003 y enero de 2004, respectivamente. Después de la limpieza inicial, las semillas fueron conservadas en el interior de bolsas de papel a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) hasta el momento de su utilización.

Ensayos de Germinación

Se incubaron semillas de *Brassica campestris* y *C. acanthoides* (seis y cuatro repeticiones de 50 semillas cada una respectivamente) en gabinetes de germinación ajustados a una temperatura constante de 25°C o a temperaturas alternadas $20/30^\circ\text{C}$ (12 h de termoperíodo). Por su parte, las semillas de *C. cardunculus*, *Cirsium vulgare* y *Sisymbrium altissimum* (cinco repeticiones de 25 semillas cada una) se incubaron a una temperatura constante de 15°C o alternadas de $20/10^\circ\text{C}$ (12 h). Complementariamente en *C. acanthoides* (tres repeticiones de 50 semillas) se evaluó el efecto de temperaturas de incubación constantes (20, 25, y 30°C), y de temperaturas alternadas de $20/30^\circ\text{C}$ (12 h). Un experimento similar se condujo con semillas de *Cynara cardunculus* incubadas a temperatura constante de 10, 15, y 20°C y alternadas de $20/10^\circ\text{C}$ (12 h).

En todos los casos, las semillas fueron incubadas en oscuridad y las cajas de Petri fueron cubiertas con film plástico para prevenir la evaporación. Las semillas se colocaron sobre dos discos de papel de filtro en cajas de Petri de 9-cm, conteniendo 5 ml de agua destilada o las soluciones de polietilenglicol (PEG) 8000 (Anedra, Buenos Aires, Argentina) preparadas de acuerdo con la ecuación de Michel (1983). Se prepararon soluciones individuales para obtener el ψ correspondiente para cada temperatura. Para incubaciones a temperaturas alternadas, se usó la solución calculada para la correspondiente temperatura media (*i.e.* para el régimen $20/10^\circ\text{C}$ se usó la misma solución que para 15°C y para el régimen $20/30^\circ\text{C}$ se empleó la solución preparada para 25°C). Para corroborar el Ψ_o resultante, se usó un osmómetro de presión de vapor (Modelo C 5200; Wescor Inc., Logan, Utah) calibrado con soluciones de CINA. Los Ψ_o evaluados fueron 0 (agua destilada), -0.3, -0.5, -0.8 y -1.11 MPa . En *Cynara cardunculus* y *Carduus acanthoides*, fueron evaluadas también las respuestas a -0.15 MPa . Con la intención de mantener estable el ψ_o durante la incubación, tanto las semillas incubadas en agua como en las soluciones de PEG se transfirieron a soluciones frescas luego de las primeras 24 h de incubación y 6 días después. La germinación fue observada diariamente durante 14 días, excepto en las semillas de *Cynara cardunculus* incubadas a 10°C , las cuales se mantuvieron dentro del gabinete de germinación por una semana más. La emergencia de la radícula de más de 2mm de largo, indicó la finalización del proceso de germinación siendo esas semillas removidas.

Análisis de Datos

Para determinar los valores de los parámetros del modelo, los datos de los conteos de germinación se sometieron al análisis de regresión en escala probit del modo descrito por Bradford (1990, 1995).

RESULTADOS

Efecto de las temperaturas constantes o alternadas de incubación sobre el porcentaje final de germinación.

Las temperaturas alternadas promovieron la germinación total en *Cynara cardunculus*, *Carduus acanthoides* y *Brassica campestris* a 0 MPa (Figura 2.1). Por el contrario, las semillas de *S. altissimum* y *C. vulgare* incubadas a 0 MPa germinaron en porcentaje similar bajo ambos regímenes térmicos (Figura 2.1). La reducción del Ψ_o de incubación demoró el tiempo de germinación y redujo la germinación total (Figura 2.1). No obstante, se observaron porcentajes de germinación mayores bajo temperaturas alternadas que aquellos registrados bajo temperaturas de incubación constante. Estos resultados muestran que la incubación bajo temperaturas alternadas redujo la sensibilidad de las semillas a los potenciales osmóticos de incubación más negativos.

Análisis Hidrotiempo

Para poder cuantificar cambios en los valores de los parámetros del modelo Hidrotiempo producidos por la incubación bajo el régimen de alternancia de temperaturas, los datos de germinación fueron analizados por este modelo. Los datos de los conteos fueron convertidos a valores probit, y corridos frente a la ecuación $\Psi_b(g) = \Psi_c(\theta_H / t_g)$, utilizando diferentes valores de θ_H hasta obtener el mejor ajuste (Bradford, 1990). Los parámetros resultantes, fueron utilizados para predecir los tiempos de germinación de acuerdo con la ecuación 2, convirtiendo los valores probit nuevamente en valores porcentuales.

$$\text{probit}_{(g)} = [\psi - (\theta_h t_g) - \psi(50)] / \sigma\psi b \quad \text{ecuación 2}$$

Como resultado del ajuste satisfactorio entre los valores experimentales de germinación y los simulados por el modelo, los parámetros derivados del modelo Hidrotiempo fueron útiles para poder comparar los efectos del régimen térmico de incubación sobre las relaciones hídricas de las semillas de todas las especies incluidas en el estudio.

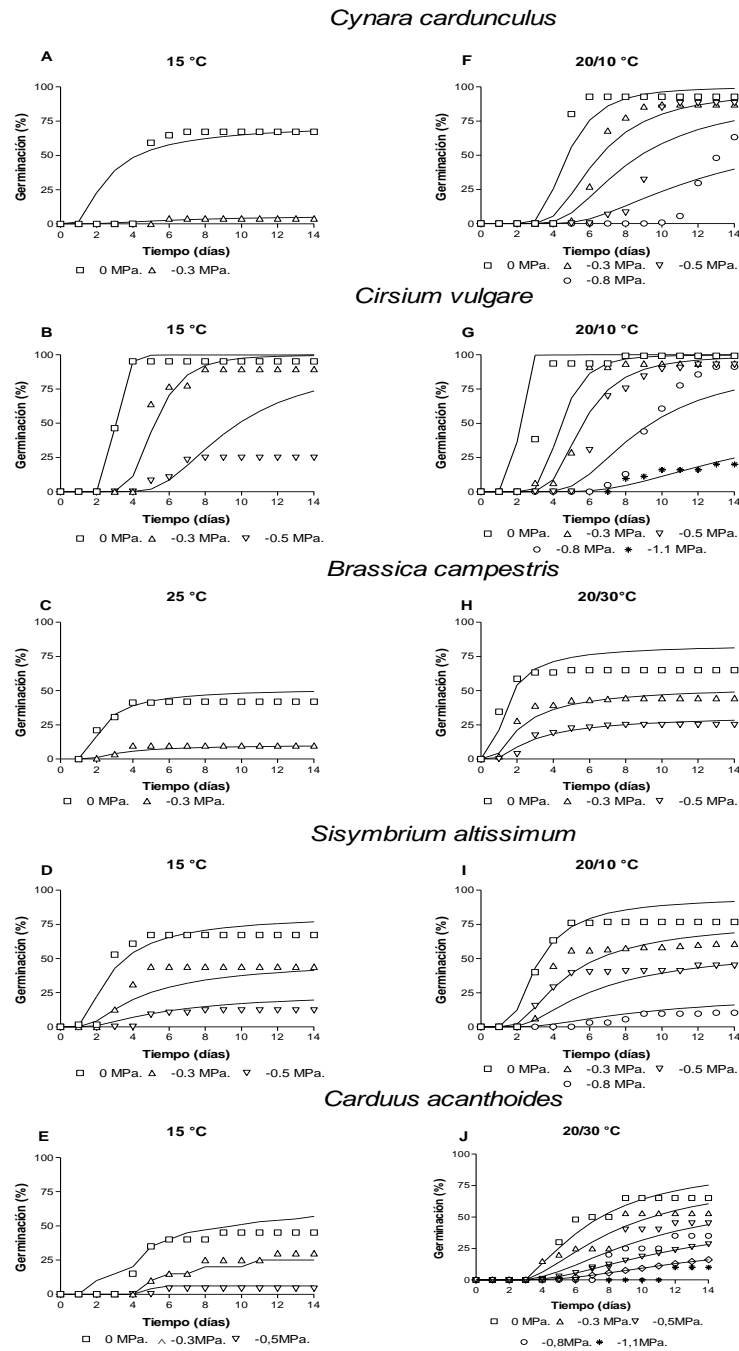


Figura 2.1. Evolución del porcentaje de germinación de las especies evaluadas en un rango de potenciales osmóticos bajo regímenes térmicos constantes (A, B, C, D, E) o alternados (F, G, H, I, J). El modelo de Hidrotiempo fue utilizado para estimar el potencial agua base medio de la población ($\psi_b(50)$), el desvío estándar del potencial base entre las semillas (σ_{ψ_b}), y la constante hidrotiempo (θ_H). Los símbolos representan los datos experimentales y las curvas representan los tiempos a germinación estimados por el modelo Hidrotiempo para cada ψ basado en los datos de la Tabla 1.

En todas las especies evaluadas, la incubación bajo temperaturas alternadas desplazó el valor del $\Psi_b(50)$ hacia valores más negativos (Tabla 2.1), siendo este hecho consistente con el mayor porcentaje de germinación observado en los ψ más bajos. En la mayor parte de los casos, la reducción del $\Psi_b(50)$ observada en semillas incubadas bajo alternancia de temperaturas no estuvo acompañada por una modificación de su desvío

estándar, en relación al obtenido bajo temperaturas constantes de incubación (Tabla 2.1). Se observó un incremento en el valor de la constante θ_H en semillas incubadas bajo temperaturas alternadas (Tabla 2.1). El rango de los valores de los coeficientes de determinación (r^2) de las regresiones fue desde un 0.67 hasta el 0.96 (Tabla 2.1).

	T (°C)	$\Psi_b(50)$ (MPa.)	σ_{Ψ_b} (MPa.)	θ_H MPa. D	r^2
<i>Cirsium vulgare</i>	15	-0.72	0.1	2.2	0.95
	20/10	-1.24	0.22	4.2	0.77
<i>Cynara cardunculus</i>	15	-0.34	0.14	1.8	0.95
	20/10	-1.17	0.15	5.8	0.77
<i>Sisymbrium altissimum</i>	15	-0.33	0.38	1.4	0.67
	20/10	-0.6	0.33	2	0.90
<i>Brassica campestris</i>	25	-0.02	0.38	0.4	0.96
	20/30	-0.55	0.58	1	0.90
<i>Carduus acanthoides</i>	25	-0.28	0.47	2.1	0.85
	20/30	-0.8	0.5	6.4	0.93

Tabla 2.1: Parámetros del modelo Hidrotiempo que caracterizan la germinación de las especies evaluadas incubadas bajo regímenes de temperaturas alternadas o temperatura constantes. El modelo Hidrotiempo fue usado para estimar el potencial agua base medio de cada población de semillas ($\psi_b(50)$), el desvío estándar del potencial agua base entre la población de semillas (σ_{ψ_b}), la constante hidrotiempo (θ_H) a partir de los tiempos a germinación en un rango de potenciales agua. Los coeficientes de determinación (r^2) indican la fracción de la variación total explicada por el modelo.

Debido a que el valor del $\Psi_b(g)$ presenta una distribución normal dentro de la población de semillas, la respuesta de cada especie al régimen térmico de incubación puede graficarse usando el valor correspondiente de $\Psi_b(50)$ y su σ_{Ψ_b} . En todas las especies estudiadas, la incubación bajo temperaturas alternadas desplazó la distribución del $\Psi_b(50)$ hacia valores más negativos (Figura 2.2 A-E, líneas punteadas).

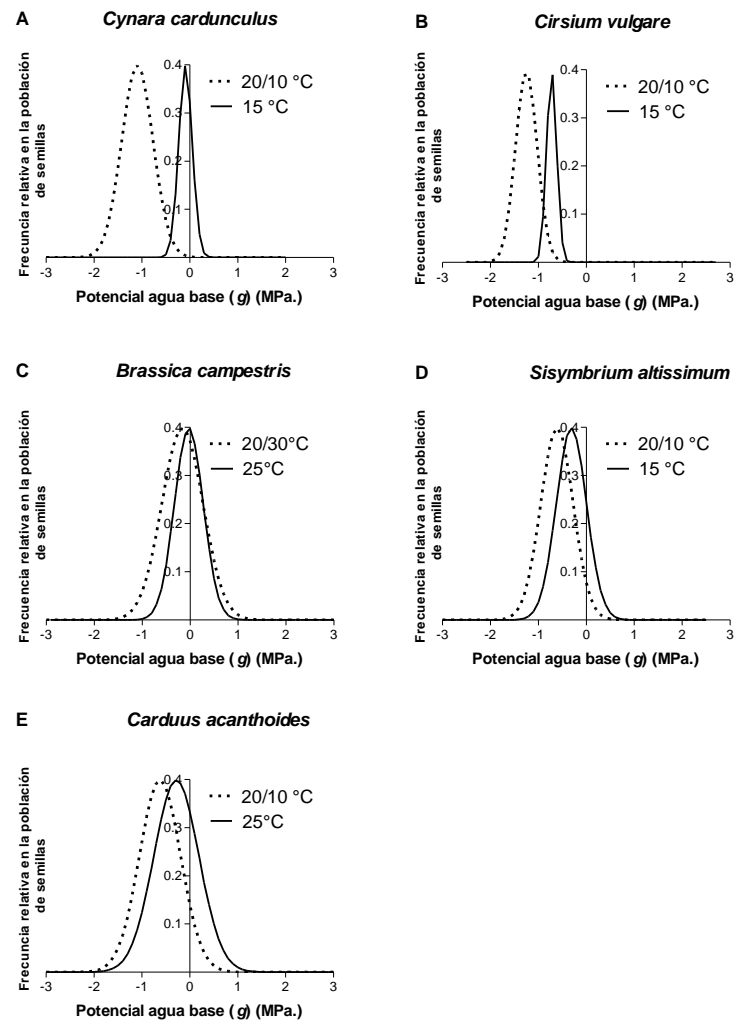


Figura 2.2: Distribución del potencial agua base (Ψ_0 (g)) de acuerdo con el tratamiento térmico de incubación.

Para descartar la posibilidad que la terminación de la dormición estuviera mediada por la temperatura máxima o mínima del ciclo de alternancia, en lugar de las alternancia térmica *per se*, fue evaluado en un experimento complementario la germinación bajo similares condiciones de estrés osmótico en semillas de dos especies (*Cynara cardunculus* y *Carduus acanthoides*), cada una representando a las respuestas observadas bajo el régimen térmico de 20/10°C o de 20/30°C. En este estudio, las semillas fueron incubadas no solamente bajo el régimen térmico de alternancia estimuladorio y la temperatura media entre los extremos del ciclo, sino también bajo la temperatura máxima y mínima del ciclo de alternancia.

En 0 MPa, las temperaturas alternadas promovieron la germinación de *C. cardunculus* (Figura 2.3 A-E). Las semillas de *C. acanthoides* alcanzaron porcentajes de germinación semejantes entre todos los tratamientos térmicos evaluados a 0MPa, con la excepción de 30°C, donde se observó una reducción marcada de este porcentaje (Figura 2.4 C). Como se esperaba, la reducción del Ψ_0 demoró gradualmente y redujo la germinación total. Este efecto fue especialmente destacado en las semillas incubadas a 10°C (la temperatura mínima del ciclo de alternancia en *C. cardunculus*) (Figura 2.3 A) y a 30°C (la máxima) en semillas de *C. acanthoides*, aunque en el ultima especie aun la

germinación en agua destilada fue restringida (Figura 2.4 C). Una vez más, la incubación bajo temperaturas alternadas incrementó la germinación total en semillas incubadas a potenciales osmóticos reducidos (Figura 2.3 y 2.4 A-E). Estos resultados destacan que la terminación de la dormición fue consecuencia de la exposición de las semillas a las temperaturas alternadas *per se* y no por alguna de las temperaturas constantes que constituyen cada ciclo de alternancia.

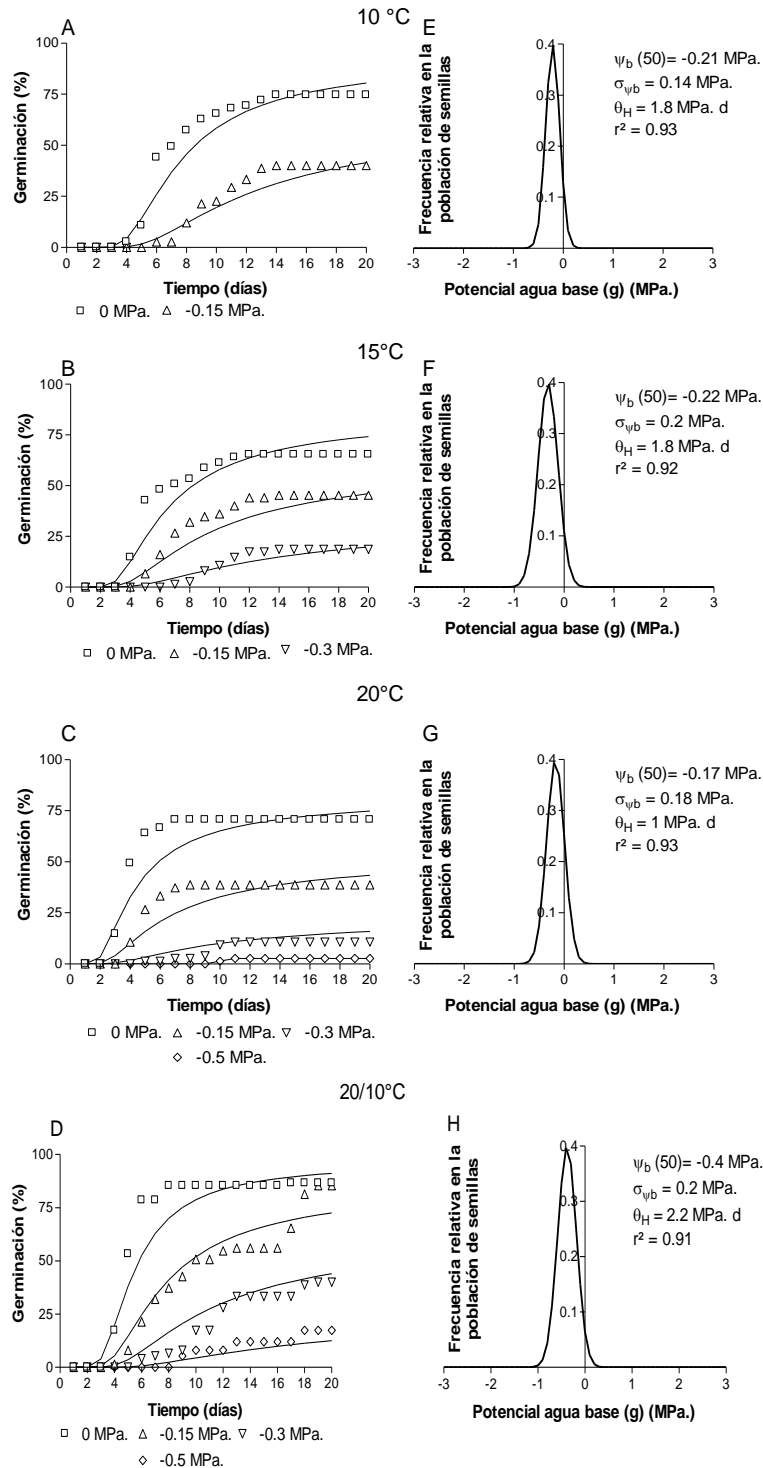


Figura 2.3 A-H. Análisis de Hidrotiempo para semillas de *Cynara cardunculus* bajo diferentes tratamientos térmicos de incubación en un rango de potenciales osmóticos decrecientes. Los tiempos a germinación para cada temperatura de incubación se muestran en el panel izquierdo. Los símbolos

representan a los datos experimentales, mientras que las líneas representan los tiempos a germinación estimados por el modelo Hidrotiempo para cada ψ basado en los parámetros mostrados en el panel derecho. La distribución del potencial agua base ($\psi_b(g)$) para cada temperatura y los parámetros del modelo que describen la germinación se muestran en el panel derecho. El coeficiente de determinación (r^2) indica la fracción de la variación total explicada por el modelo.

Los datos provenientes de los conteos de germinación para cada especie y tratamiento térmico fueron analizados mediante el modelo hidrotiempo. En ambas especies, la incubación bajo alternancia de temperaturas desplazó el valor del $\Psi_b(50)$ hacia valores más negativos (Figura 2.3 y 2.4, paneles derechos). Bajo las diferentes temperaturas constantes evaluadas, se observaron valores similares de $\Psi_b(50)$. Una excepción se observó en semillas de *Carduus acanthoides* incubadas a 30°C donde se observó un incremento del $\Psi_b(50)$. Este hecho se alinea con la reducción drástica de la germinación observada bajo esta temperatura, aun en semillas incubadas en agua destilada. No se observaron modificaciones en el σ_{ψ_b} , (Figuras 2.3 y 2.4, E-H). Al igual que en el primer grupo de experimentos, se observó un incremento del valor de la constante θ_H en las semillas incubadas bajo alternancia de temperaturas (Figuras 2.3 y 2.4, E-H). El valor de r^2 de las regresiones probit fue desde 0.83 hasta 0.93. La respuesta (*i.e.* distribución normal del valor de $\Psi_b(g)$ de cada población de semillas) a cada régimen térmico de incubación fue graficada usando los valores de $\Psi_b(50)$ y su $\sigma_{\psi_{50}}$ (Figuras 2.3 y 2.4, E-H).

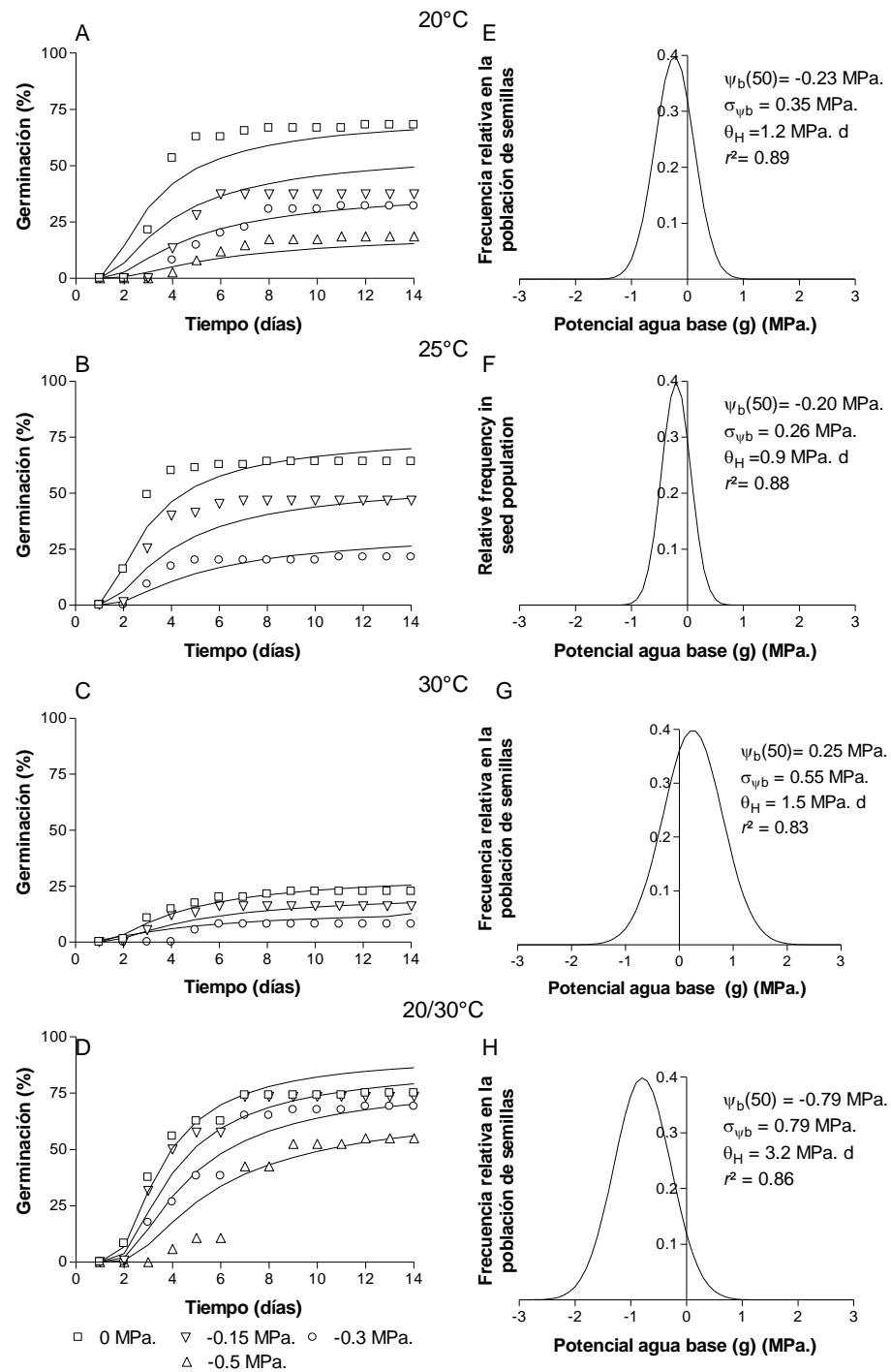


Figura 2.4 A-H. Análisis Hidrotiempo para semillas de *Carduus acanthoides* bajo diferentes tratamientos térmicos de incubación en un rango de potenciales osmóticos decrecientes. Los tiempos a germinación para cada temperatura de incubación se muestran en el panel izquierdo. Los símbolos representan a los datos experimentales, mientras que las líneas representan los tiempos a germinación estimados por el modelo Hidrotiempo para cada ψ basado en los parámetros mostrados en el panel derecho. La distribución del ψ_b (g) para cada temperatura y los parámetros del modelo que describen la germinación se muestran en el panel derecho. El coeficiente de determinación (r^2) indica la fracción de la variación total explicada por el modelo.

DISCUSIÓN

Las temperaturas alternadas promovieron la germinación total en relación con lo observado a temperaturas constantes. Estos resultados son coincidentes con lo reportado por Soriano *et al.* (1963) en *Brassica campestris*, Kruk y Benech-Arnold (2000) en *Carduus acanthoides*, y Forcella y Wood (1986) en *Cirsium vulgare*. Por el contrario, en *C. vulgare* los resultados obtenidos bajo temperaturas alternadas difieren con los publicados por Groves y Kaye (1989). Las mayores temperaturas utilizadas en su estudio (20/30°C) o un nivel de dormición mayor en su población de semillas podrían explicar estas diferencias. La incubación bajo temperaturas alternadas redujo marcadamente la sensibilidad de las semillas a los ψ de incubación bajos (Figuras 2.2 a 2.4), ya que ante potenciales osmóticos idénticos se observaron porcentajes de germinación más elevados bajo alternancia térmica que a temperaturas constantes.

La incubación bajo temperaturas alternadas redujo el $\Psi_b(50)$. Este desplazamiento, explicó la mayor tolerancia al efecto inhibitorio sobre la germinación causada por una reducción del ψ_o . La reducción observada en el valor del $\Psi_b(50)$ tiene implicancias fisiológicas importantes. Este hecho, permite proponer que el mecanismo fisiológico por el cual las temperaturas alternadas terminan con la dormición, se ejerce mediante un incremento en el potencial de crecimiento del embrión (*i.e.* la capacidad del embrión para superar a condiciones físicas o ambientales que limitan su crecimiento).

Para evaluar la posibilidad que alguno de los componentes del ciclo de alternancia (*i.e.* temperatura máxima o mínima) y no la exposición a la alternancia térmica *per se* fueran las responsables de estos cambios fisiológicos, se analizó la respuesta a aquellas temperaturas y en ningún caso se observaron cambios en el $\Psi_b(50)$ similares a los causados por las temperaturas alternadas (Figuras 2.3 y 2.4). Más aún, algunos de esos componentes fueron claramente inhibitorios para la germinación cuando fueron dados como una temperatura constante (*e.g.* incubación de *Carduus acanthoides* a 30°C).

En la medida que el $\Psi_b(50)$ torna hacia valores más negativos, la germinación puede ocurrir en un rango de Ψ_o más amplios. Bradford (1995) señaló que si el $\Psi_b(50)$ se reduce, tanto el porcentaje total como la tasa de germinación deben aumentar. Sin embargo, en semillas incubadas bajo alternancia de temperaturas solamente el primero de estos efectos fue observado. Este hecho, se fundamenta en el aumento del valor de la constante θ_H observado bajo temperaturas alternadas. El mayor valor de θ_H , se contrapuso con una esperada tasa de germinación más rápida a partir de la reducción de $\Psi_b(50)$. El incremento de la θ_H , se origina en el tiempo requerido por las temperaturas alternadas para ejercer su efecto estimulador. Fue reportado, por ejemplo, que semillas de *Sorghum halepense* requieren alrededor de 20 ciclos para la respuesta máxima a la alternancia de temperaturas (Benech-Arnold *et al.*, 1990) y que *Phragmites australis* necesita de 3 ciclos (Ekstam y Forsebt, 1999). En la Figura 2.4 se evidencia esto, ya que se observa un patrón de germinación bifásico bajo alternancia de temperaturas. Además, la temperatura máxima del ciclo resultó inhibitoria tomándole alrededor de seis días para que los efectos promotores de los ciclos de alternancia se hagan evidentes.

La incubación bajo diferentes temperaturas constantes de incubación no modificó los valores de $\psi_b(50)$ en *Cynara. cardunculus* y *Carduus. acanthoides*. No obstante, en esta última especie cuando las semillas se incubaron a 30°C, se observó un incremento del $\psi_b(50)$. Una observación similar fue previamente informada para semillas de lechuga (Bradford y Somasco, 1994; Dutta y Bradford, 1994) y papa (Alvarado y Bradford, 2002) incubadas a temperaturas supra óptimas, y para semillas de *Orobanch*

aegyptiaca por Kebreab y Murdoch (1999) cuando la incubación se desarrolló tanto a temperaturas sub o supra optimas.

Las poblaciones de *Cynara cardunculus* y *Carduus acanthoides* usadas en ambos experimentos no fueron las mismas. Por lo tanto, no se esperó que los parámetros poblacionales derivados de la aplicación del modelo hidrotiempo sean semejantes. Probablemente, el nivel de dormición de las poblaciones utilizadas en ambos experimentos difiera y en consecuencia también la sensibilidad a la alternancia de temperaturas (Batlla *et al.*, 2003). Este argumento explica el motivo por el cual el cambio en el $\Psi_b(50)$ haya sido de diferente magnitud entre ambos experimentos (Tabla 2.1 y Figura 2.3, panel derecho).

Fue reportado que la aplicación exógena de GAs (*i.e.* otro tratamiento promotor de la germinación) también ejerce un desplazamiento hacia valores más negativos del $\psi_b(50)$ (Ni y Bradford, 1993). Por lo tanto, puede proponerse que aquellos factores que reducen el nivel de dormición de poblaciones de semillas (*e.g.* estratificado y postmadurado en seco), y aquellos que la terminan (*i.e.* temperaturas alternadas, GAs) operen a través de una reducción en el valor del $\Psi_b(50)$. Dutta y Bradford (1994), expresaron que aquellos factores que provocan la terminación de la dormición podrían actuar a través de un mecanismo general que involucra cambios en la sensibilidad al ψ_o del ambiente.

Con la excepción de *Cynara cardunculus* y *Brassica. campestris*, no se observaron modificaciones del σ_{ψ_b} como resultado de la incubación bajo temperaturas alternadas. Por lo tanto, las temperaturas alternadas actúan principalmente mediante un cambio del $\Psi_b(50)$ con un efecto menor sobre la distribución del Ψ_b entre las semillas de la población. Esto significa que el efecto de la alternancia de temperaturas fue común sobre todas las semillas y no actuó diferencialmente entre diferentes fracciones de la población.

En semillas expuestas a condiciones naturales de alternancia térmica, la reducción observada del $\Psi_b(50)$ significa una ampliación del rango de situaciones hídricas permisivas para la germinación. Esta capacidad podría compensar la menor disponibilidad de agua (menor potencial agua) en la capa del suelo más superficial, debido a la acción de la radiación solar y del viento, factores desecan esta capa de suelo más rápidamente que un suelo provisto de la cobertura vegetal.

Los resultados presentados permiten aceptar la hipótesis I) planteada al inicio de esta tesis. La misma planteaba que: las temperaturas alternadas incrementan el potencial de crecimiento del embrión permitiendo que las semillas germinen a ψ_o más negativos. Este hecho se traduce en un desplazamiento hacia valores más bajos del valor de $\psi_b(50)$ de la población. Los resultados presentados en este Capítulo, muestran que el modelo de Hidrotiempo fue útil para explicar cuantitativamente que el efecto promotor de la alternancia de temperaturas.

CAPITULO 3

NATURALEZA HORMONAL DE LAS RESPUESTAS DE LAS SEMILLAS A LAS TEMPERATURAS ALTERNADAS

INTRODUCCION

La exposición a las temperaturas alternadas es un requerimiento absoluto para la germinación de muchas especies (Probert, 1992). El sentido ecológico de este requerimiento se asocia con la estrategia de las poblaciones de semillas de detectar brechas en la vegetación, la profundidad de entierro en el suelo o su posición debajo del agua (Roberts y Totterdell, 1981; Thompson y Grime, 1983; Pons y Schroder, 1985). En la cercanía de la superficie del suelo, la temperatura diurna fluctúa menos debajo de un canopeo que de un suelo al descubierto (Balisky y Burton, 1993). Al presente se encuentra bien documentado que los requerimientos de alternancia de temperatura están distribuidos entre muchos géneros botánicos. Sin embargo, los mecanismos fisiológicos que actúan detrás de esta respuesta son conocidos pobremente. Por ejemplo Benech-Arnold *et al.* (1995), demostraron que las temperaturas alternadas estimulaban la germinación de cariopses inmaduros de sorgo a través de una reducción de la sensibilidad de los embriones al efecto inhibitor del ABA. Recientemente Mendiondo (2010) encontró que esa reducción en la sensibilidad al ABA está mediada por una regulación hacia abajo de la transcripción de varios genes que codifican para componentes de la señalización del ABA. En el Capítulo anterior, fue descrito que la incubación bajo temperaturas alternadas desplazó el $\psi_b(50)$ de varias poblaciones de semillas hacia valores más negativos. Esto implica que las temperaturas alternadas terminan con la dormición a través de un incremento en el potencial del embrión para superar resistencias físicas y/o osmóticas que obstaculizan su crecimiento. De todas las especies evaluadas y cuyos resultados fueron presentados en el Capítulo precedente *Cynara cardunculus* fue la que exhibió un mayor desplazamiento en el valor del $\psi_b(50)$. Esta respuesta fue la que indujo a que en los diferentes experimentos presentados de aquí en adelante se la eligiese como especie modelo para la comprensión de la respuesta a las fluctuaciones de temperatura.

El proceso de germinación es promovido por las giberelinas (GAs) e inhibido por el ABA. La síntesis de GA *de novo* es, en semillas de algunas especies, un requerimiento importante para la terminación de la dormición (Jacobsen y Olzewski, 1993). En ese sentido, es conocido que la presencia de inhibidores de la biosíntesis de GAs como el paclobutrazol (PCB) y el uniconazol inhibe irreversiblemente la germinación (Nambara *et al.*, 1991). Por otro lado, el ABA fue definido como un regulador positivo de la inducción y el mantenimiento de la dormición (Kucera *et al.*, 2005). El ABA desempeña un rol crítico tanto en el establecimiento como el mantenimiento de la dormición de semillas (Le Page-Degivry *et al.*, 1996; Grappin *et al.*, 2000). La participación del ABA en la inducción de la dormición, fue demostrada claramente por el nivel de dormición reducido observado en mutantes ABA-deficientes o -insensibles (Li y Foley, 1997). El mantenimiento de la dormición luego de la imbibición en el ecotipo con dormición de *Arabidopsis* (CVI) (Ali-Rachedi *et al.*, 2004) y en otras especies, requiere de la síntesis de ABA *de novo* (Le Page-Degivry *et al.*, 1997; Grappin *et al.*, 2000; Benech-Arnold *et al.*, 2006). El ABA se sintetiza a partir de un precursor carotenóide C₄₀, por lo que la presencia de inhibidores químicos de la síntesis de carotenoides (*e.g.* fluridone) previene la formación de este compuesto (Zeevaart, 1988). Los efectos del ABA se relacionan tanto con su contenido endógeno, como con la sensibilidad que presentan las semillas a su acción (Corbineau *et al.*, 2002). A partir de estos y otros resultados publicados se puede concluir que el mantenimiento de la dormición requiere de una relación ABA-GA alta y/o una sensibilidad alta al ABA. Por el contrario, la salida de la dormición se asocia con: un incremento en la síntesis de GA, la inactivación del ABA,

un incremento en la sensibilidad a las GAs y la pérdida de sensibilidad al ABA (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). El balance entre ambos reguladores de crecimiento se encuentra sujeto también a la acción de factores ambientales. Toyomasu *et al.* (1993, 1998) y Yamaguchi *et al.* (1998), hallaron que la promoción de la germinación por el Pfr, la forma activa del fitocromo, luego de la exposición de las semillas a la luz roja está mediada por un incremento en la biosíntesis de GAs. Esto incrementa el potencial de crecimiento del embrión y reduce la resistencia física de las cubiertas a la emergencia de la radícula. El incremento del potencial de crecimiento del embrión producido por el Pfr, fue asociado también con una reducción en la sensibilidad y el contenido de ABA (Seo *et al.*, 2006) y un incremento en la sensibilidad a las GAs (Yang *et al.*, 1995; Arana *et al.*, 2006). Considerando que las temperaturas alternadas también promueven la germinación a través de un incremento en la capacidad del embrión para superar las restricciones físicas a su crecimiento, parece razonable especular con una regulación de tipo hormonal. Más aún, se puede hipotetizar que la exposición de las semillas a las temperaturas alternadas pone en marcha una cadena de eventos comunes a los observados como resultado de exponer las semillas a la luz roja. En este Capítulo se pone a prueba esa hipótesis a partir de la evaluación de 1) el contenido de ABA y la sensibilidad al ABA en semillas y embriones de *Cynara cardunculus* durante su incubación a temperaturas alternadas o constantes, 2) Las respuestas a la presencia de GAs exógenas a temperaturas alternadas o constantes, y 3) la posibilidad de que el requerimiento de alternancia de temperaturas puede ser remplazado por la luz roja o las GAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas

Se recolectaron aquenios maduros de *Cynara cardunculus* (L.) (de aquí en adelante denominados semillas) durante enero de 2006 en las adyacencias de la Ruta Nacional 205 en Alejandro Petión, Provincia de Buenos Aires (Lat. 34° 59' S, Long. 58° 40' O). Después de la limpieza inicial, las semillas fueron conservadas dentro de bolsas de papel a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) durante tres meses hasta su uso en tres experimentos independientes (análisis de hidrotiempo, sensibilidad a la presencia de ABA y cuantificación del contenido endógeno de ABA).

Experimentos de germinación

La germinación está expresada como el porcentaje acumulado del total de semillas. Cada valor representa la media \pm EEM de tres repeticiones de 25 semillas cada una. La germinación fue registrada durante 14 días consecutivos. Las semillas con una protrusión de la radícula mayor a 2mm fueron consideradas como germinadas y luego removidas. Los estudios de germinación se condujeron en gabinetes de germinación ajustados a 20°C (temperatura constante) o temperaturas alternadas (25°C , 12h/ 15°C , 12 h). Las semillas se incubaron en oscuridad dentro de cajas de Petri de 9 centímetros de diámetro y fueron cubiertas con film plástico para prevenir la evaporación.

Análisis de hidrotiempo

Para determinar los efectos de la alternancia de temperaturas ($25/15^\circ\text{C}$) sobre los parámetros del modelo, las semillas se colocaron en cajas de Petri que contenían agua o soluciones de diferente concentración de polietilenglicol (PEG) 8000 (Anedra, Buenos Aires, Argentina) preparadas de acuerdo con la ecuación de Michel (1983). Los potenciales osmóticos resultantes fueron medidos con un osmómetro de presión de vapor (VPO, Modelo 5100 C. Wescor Inc., Logan, UT, USA) calibrado con soluciones de ClNa. Las soluciones de PEG se remplazaron luego de 24 h de incubación y de ahí en más cada 6 días. Los parámetros del modelo de hidrotiempo fueron también determinados en semillas incubadas a temperatura constante (20°C). Bajo esta condición térmica, los parámetros fueron también calculados para semillas tratadas con luz roja, GA_3 (durante la incubación) y oscuridad. Las semillas irradiadas fueron pre-incubadas en agua destilada en oscuridad a 20°C por 24 h. Luego de esta pre-incubación, las semillas se irradiaron durante 2 h con luz roja provista por tubos fluorescentes Philips 40/15 40 W (Philips, Eindhoven, Holanda) para obtener una proporción calculada de Pfr de 0.87 (Casal *et al.*, 1991). Luego del tratamiento lumínico, las semillas se transfirieron a cajas de Petri que contenían agua destilada o a las soluciones de diferente concentración de PEG. Todas estas prácticas, incluyendo los conteos de germinación se desarrollaron bajo luces de seguridad verdes. Para determinar los efectos del GA_3 sobre los parámetros del modelo de hidrotiempo, una solución combinada de GA_3 más PEG se preparó disolviendo la cantidad requerida de PEG de acuerdo con la ecuación de Michel en $100 \mu\text{M}$ de GA_3 . La solución GA_3 más PEG se remplazó luego de 24 h y cada 6 días. Los tiempos a germinación fueron analizados de acuerdo con el modelo de hidrotiempo usando la herramienta Solver de Microsoft Excel® 2003. Este módulo permite maximizar el ajuste entre los datos obtenidos experimentalmente con los simulados por el modelo. El criterio de optimización

utilizado para obtener el mejor ajuste fue el mínimo error del cuadrado medio (RMSE) entre los datos simulados y los datos obtenidos experimentalmente.

Tratamientos con ABA, GA₃, fluridone y paclobutrazol

La sensibilidad de las semillas incubadas a temperaturas alternadas o constantes al (+)-cis, trans-ABA (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) fue evaluada mediante la incubación en soluciones de diferente concentración de ABA (6 ml) (0, 1, 50 y 100 μ M). La sensibilidad de las semillas incubadas bajo temperaturas alternadas o constantes al GA₃ se determinó mediante la incubación en soluciones de diferente concentración de GA₃ (6 ml) (0, 1, 25, 50 y 100 μ M). Las semillas fueron también incubadas en presencia de 6 ml de 50 μ M fluridone (1-metil-3-fenil-5-3 triurometil-fenil-piridone) (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS, USA) y 0.068 mM paclobutrazol (PCB) ((2RS, 3RS-1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H1,2,4-Triazol-1-il) pentan-3ol, CRESTAR, Syngenta Crop Protection AG, Birsfelden, Suiza). Las soluciones de fluridone fueron preparadas disolviendo este compuesto en una solución 0.1 % de acetona hasta la disolución completa y luego diluyendo en agua (da Silva *et al.*, 2004). Un experimento control no demostró ningún efecto negativo de la acetona sobre la germinación. Se evaluó también la germinación de semillas en una solución combinada de PCB (0.068 mM) más GA₃ (50 μ M) e incubadas a 25/15°C. En el experimento de sensibilidad al ABA, los tratamientos fueron combinaciones factoriales con cuatro dosis de ABA y dos condiciones térmicas (20°C vs. 25/15°C). En el experimento de sensibilidad a las GAs, los tratamientos fueron combinaciones factoriales con cinco dosis de GAs y dos condiciones térmicas (20°C vs. 25/15°C). Los datos de germinación fueron sometidos al análisis de la varianza (Statistix 8.0, Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). La comparación entre medias fue realizada mediante el Test de Tukey al 5% de probabilidad.

Cuantificación del ABA

Para cuantificar el contenido endógeno de ABA en semillas incubadas a temperaturas alternadas (25/15°C) o constantes (20°C), tres repeticiones de aproximadamente 100 mg de semillas fueron recolectadas con intervalos de 12-h los primeros cuatro días de incubación. También se muestrearon con intervalos diarios semillas no-germinadas incubadas a 20°C desde el cuarto día en adelante. Cada muestra fue congelada inmediatamente en N₂ líquido. Posteriormente las semillas fueron liofilizadas, molidas, pesadas y almacenadas a -18°C hasta su utilización para la cuantificación de ABA. Esta determinación se realizó mediante radio inmunoensayo empleando el anticuerpo monoclonal MAC 252 siguiendo el protocolo descrito en Steinbach *et al.* (1995). Fue realizada una curva estándar que relacionó concentraciones conocidas de (+) ABA de 125, 250, 500, 1000 y 2000 pg/ 50 μ L realizados por duplicado y valores de radioactividad medido en cuentas por minutos. Se utilizaron 50 μ L de cada muestra, por duplicado. Las concentraciones de ABA en las muestras, se calcularon ingresando a la curva estándar de calibración los valores de radioactividad de las muestras medida en cuentas por minuto leídas en el contador de centelleo líquido. Los resultados presentados corresponden a los valores medios de tres repeticiones \pm EEM.

RESULTADOS

Análisis de hidrotiempo de la germinación en semillas incubadas a temperaturas alternadas y semillas incubadas a temperatura constante tratadas con luz roja y GA₃.

La incubación bajo el régimen de alternancia de temperaturas (25/15°C) aumentó el porcentaje total de germinación en relación al observado en semillas incubadas a temperatura constante (20°C) (Figuras 3.1 A y D). Semillas incubadas en potenciales osmóticos más negativos germinaron menos, con la excepción de aquellas tratadas con GA₃ incubadas en -0.3 MPa (Figura 3.1 C). Para poder cuantificar los cambios en los parámetros del modelo de hidrotiempo, se analizaron los datos de conteos obtenidos en cada tratamiento. Los parámetros resultantes fueron usados para predecir los tiempos a germinación de acuerdo con la siguiente ecuación: $\text{probit}(g) = [\psi - (\theta_H/t_g) - \psi_b(50)] / \sigma_{\psi_b}$, convirtiendo los valores probit nuevamente en valores porcentuales. Ambos regímenes térmicos (25/15°C y 20°C) fueron igualmente efectivos en desplazar hacia valores más negativos el $\psi_b(50)$ de la población en presencia de GA, cuando se los comparó con los parámetros obtenidos a 20°C sin la hormona (Figuras 3.1H y G). La irradiación con luz roja, previa a la incubación a 20°C, redujo el $\psi_b(50)$ en menor medida que la incubación a 25/15°C o las GA₃ (Figuras. 3.1 E y F). La reducción del $\psi_b(50)$ por las temperaturas alternadas y GA₃ fue acompañada por una disminución del valor de la constante de hidrotiempo (θ_H) comparado con el tratamiento a 20°C. No fueron observados cambios importantes en el valor de σ_{ψ_b} entre el control en oscuridad y el resto de los tratamientos.

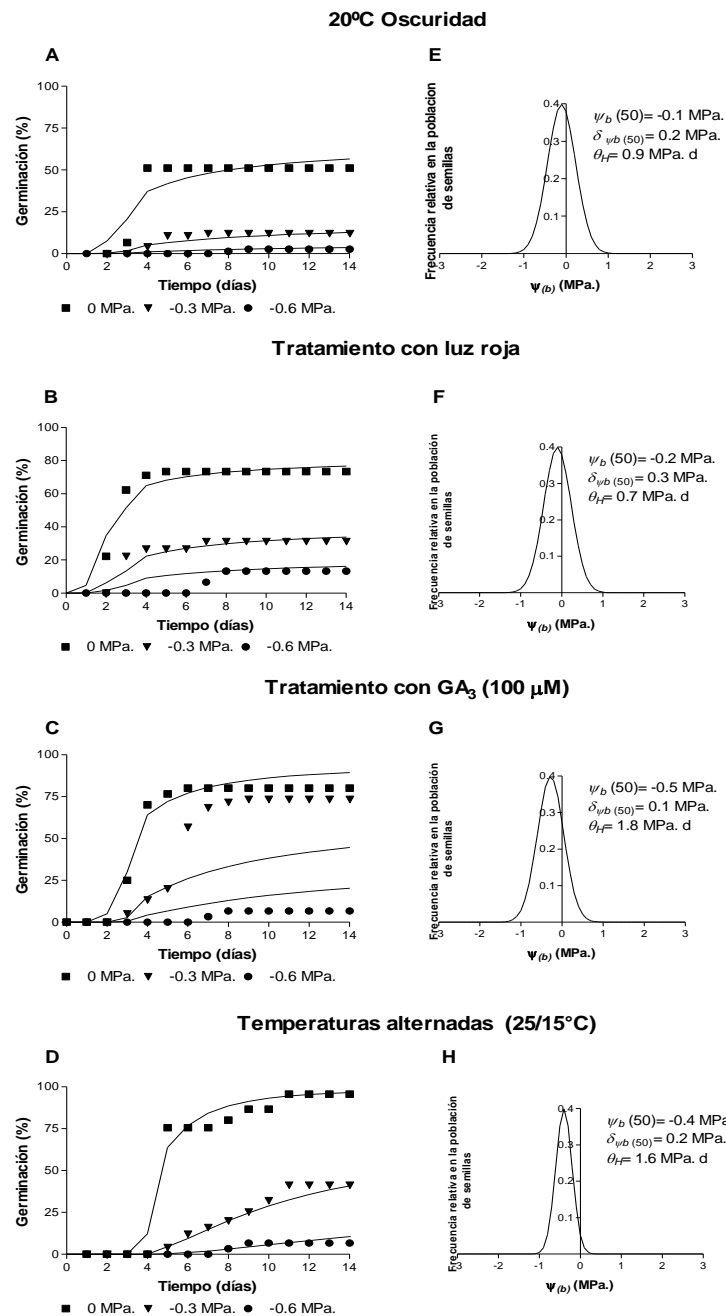


Figura 3.1. Germinación acumulada en función del tiempo de semillas de *Cynara cardunculus* incubadas a (A) 20°C en potenciales agua de 0, -0.3 y -0.6 MPa, (B) a 20°C bajo potenciales agua de 0, -0.3 y -0.6 MPa luego de un tratamiento con luz roja, (C) a 20°C en presencia de 100 μM GA₃, y (D) a 25/15°C a potenciales agua de 0, -0.3 MPa y 0.6 MPa. Los símbolos representan a los datos experimentales, y las líneas representan los tiempos a germinación estimados por el modelo de hidrotiempo. (E) a (H) Distribución normal de la frecuencia relativa de ψ_b (g) valores correspondientes a las figuras (A) a (D), respectivamente. Se muestran los valores del desvío estándar (δ_{ψ_b}), y la constante de hidrotiempo (θ_H). *Papel del ABA en la respuesta de las semillas a las condiciones térmicas de incubación.*

Los dos efectos principales, dosis de ABA y los tratamientos térmicos sobre la germinación, fueron significativos ($P < 0.001$). Por otro lado, la interacción entre la dosis de ABA y el tratamiento térmico no fue significativa ($P = 0.96$). Las semillas incubadas a temperaturas alternadas exhibieron un porcentaje de germinación mayor

que las incubadas a 20°C a la misma concentración de ABA (Figura 3.2). El total de la germinación en agua destilada (ABA 0 μM) bajo 25/15°C fue de $96.4 \pm 1.7\%$ (media \pm EE) y en semillas incubadas a 20°C alcanzó un $36.6 \pm 8.3\%$. El porcentaje de germinación final bajo el régimen de temperaturas alternadas se redujo desde el $96.4\% \pm 1.7$ (ABA 0 μM) hasta un $56.6 \pm 8.3\%$ en 100 μM de ABA. En cambio, cuando la incubación se realizó bajo el régimen de temperatura constante, los porcentajes finales de germinación en 0 y 100 μM ABA fueron de $36.8\% \pm 8.3$ y $1.6\% \pm 1.6$, respectivamente (Figura 3.2). La presencia de fluridone (50 μM), promovió la germinación de semillas incubadas a 20°C ($85.6\% \pm 3.8$) (Figura 3.2) sugiriendo que la biosíntesis de ABA luego de la imbibición puede ser responsable de la inhibición de la germinación observada a 20°C. Para examinar esta posibilidad, se realizó la determinación del contenido de ABA durante la incubación en semillas incubadas bajo condiciones de temperaturas constantes y alternadas.

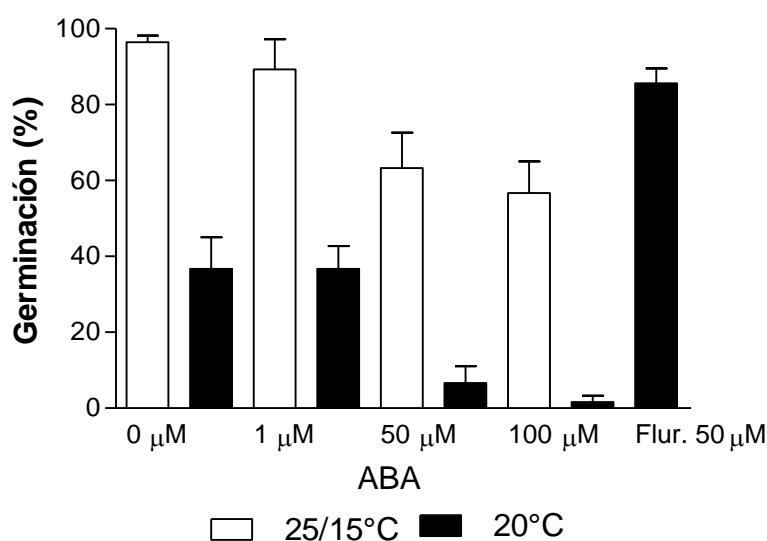


Figura 3.2. Porcentaje final de germinación en semillas de *Cynara cardunculus* incubadas en diferentes concentraciones de ABA. Barras abiertas muestran la germinación a temperaturas alternadas (25/15°C) y barras cerradas muestran la germinación a temperatura constante (20°C). Las barras de error muestran los EE. Los experimentos de germinación se condujeron durante 16 días.

El contenido de ABA en semillas secas fue de 19.71 ± 1.16 pg/mg semilla (0 h de imbibición) (Figura 3.3). Los contenidos de ABA en semillas incubadas a 25/15°C y a 20°C fueron similares hasta las 60 h posteriores a la imbibición (Figura 3.3). El contenido de ABA disminuyó en semillas incubadas a 25/15°C con anterioridad a la emergencia de la radícula (Figura 3.3; tiempo de emergencia de la radícula señalado por una flecha). Los contenidos de ABA en semillas incubadas a 20°C fueron de 27.7 ± 3.4 pg/mg a las 72 h y de 26.3 ± 4.19 pg/mg a las 84 h. Los contenidos de ABA en semillas incubadas a 25/15°C fueron de 20.3 ± 1.41 pg/mg a las 72 h y de 19.37 ± 3.12 pg/mg a las 84 h. Concentraciones estables de ABA fueron observadas en semillas incubadas a 20°C luego de las 72 h de incubación en adelante.

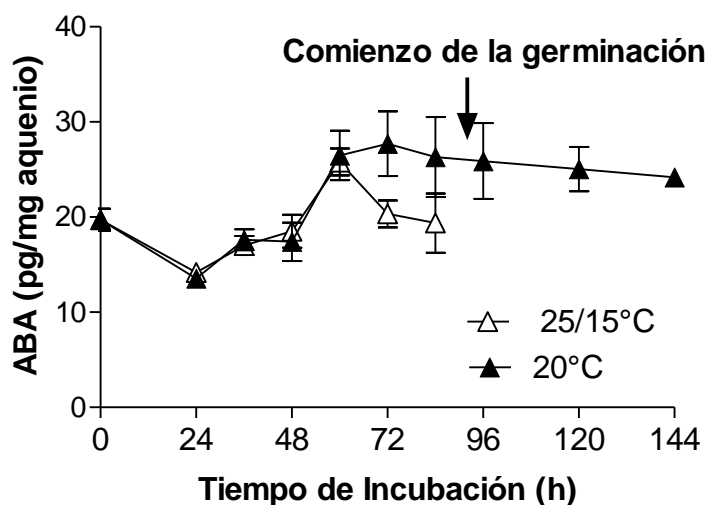


Figura 3.3. Contenido de ABA (pg/mg achenio seco) en semillas de *Cynara cardunculus* a diferentes tiempos de incubación. Símbolos abiertos representan el contenido de ABA en semillas incubadas a 25/15°C, símbolos cerrados representan el contenido de ABA en semillas incubadas a 20°C. Los datos representan valores medios de tres repeticiones \pm EE.

Papel de las GAs en las respuestas de las semillas a las condiciones térmicas de incubación

Los dos efectos principales, tratamiento térmico (20°C y 25/15°C) y la respuesta de las semillas a las dosis de GAs, y su interacción fueron estadísticamente significativas ($P < 0.001$). El porcentaje de germinación no difirió entre 25/15°C y 20°C cuando las semillas se incubaron en presencia de GA_3 (1-100 μ M). La germinación de las semillas incubadas bajo temperaturas alternadas en presencia de GA_3 no superó a la observada en semillas incubadas en agua (Figura 3.4). Por el contrario, se registró un porcentaje de germinación reducido en semillas incubadas a temperatura constante en agua (31.6% \pm 9.2) (media \pm EE) y en presencia de una solución 0.068 mM de PCB (21.3% \pm 3.3 y 16% \pm 4 para 20°C y 25/15°C respectivamente) (Figura 3.4). La incubación en una solución combinada de PCB (0.068 mM) más GA_3 (50 μ M) a 25/15°C restableció la germinación (88.8% \pm 8) en un porcentaje similar a aquel observado en agua destilada (90.8 \pm 3.3%) (Figura 3.4).

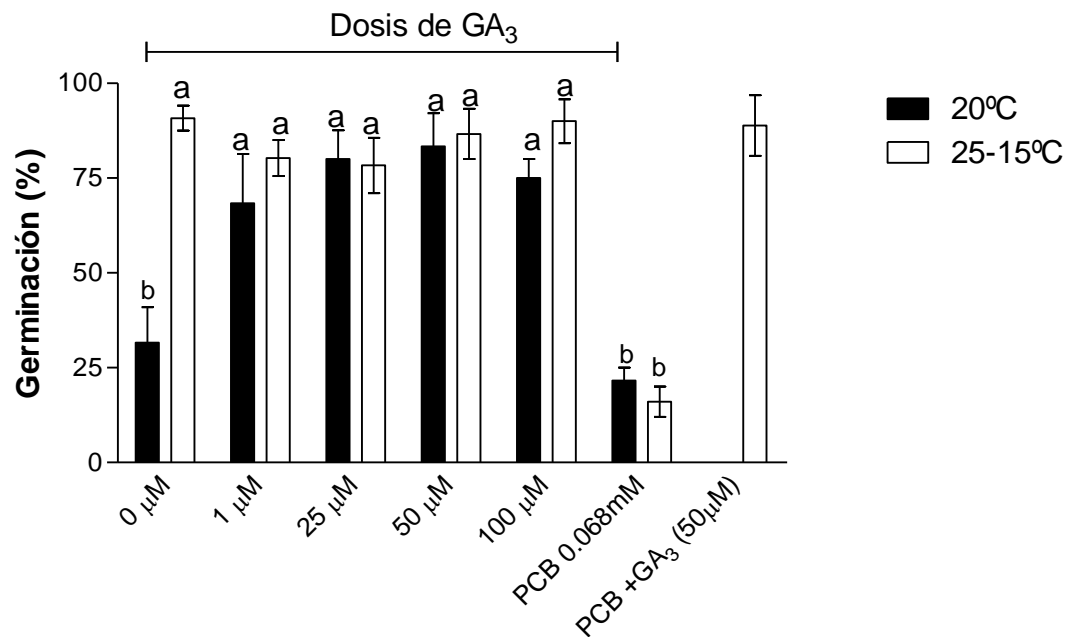


Figura 3.4. Porcentaje final de germinación de semillas de *Cynara cardunculus* incubadas a temperaturas alternadas (25/15°C) (barras abiertas) o a temperaturas constantes (20°C) (barras cerradas) en diferentes soluciones (ver leyenda por debajo del eje x). Barras verticales representan al EE. Los experimentos de germinación fueron desarrollados durante 16 días. Letras diferentes por encima de cada barra indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ($\alpha = 0.05$).

DISCUSIÓN

Las temperaturas alternadas y la luz son factores ambientales que terminan con la dormición de semillas de muchas especies (Batlla *et al.*, 2005). Para el caso de la luz, un importante número de trabajos aborda las respuestas provocadas por este estímulo conociéndose muchos aspectos de esta respuesta (i.e. percepción, señalización y traducción de la señal). Por el contrario, se conoce poco sobre los mecanismos fisiológicos y bioquímicos involucrados en la respuesta de las semillas a las temperaturas alternadas. En el capítulo anterior la mejora de porcentaje de germinación en semillas de *Cynara cardunculus* expuestas a la temperaturas alternadas quedó demostrado claramente ya que ninguna de las temperaturas constantes incluidas (i.e. la temperatura mínima, la temperatura máxima o la temperatura media) dentro del ciclo de alternancia pero la fluctuación *per se* liberaron a *C. Cardunculus* de la dormición. El modelo de hidrotiempo indicó que la terminación de la dormición por temperaturas alternadas estuvo acompañado por un desplazamiento del ψ_b hacia valores más negativos. Como ya ha sido mencionado, la implicancia fisiológica de este desplazamiento reside en que las temperaturas alternadas terminan con la dormición a través de un incremento en la capacidad del embrión para superar restricciones físicas u osmóticas. El potencial de crecimiento del embrión está regulado positivamente o negativamente por las GAs o el ABA, respectivamente (Karsen *et al.*, 1989; Sánchez y de Miguel, 1997; da Silva *et al.*, 2004). La acción hormonal tiene lugar tanto por su contenido en los tejidos seminales como por la sensibilidad celular a las hormonas. Los resultados expuestos en el presente Capítulo señalaron una reducción clara de la sensibilidad al ABA bajo el régimen de temperaturas alternadas (Figura 3.2). Este resultado está en plena coincidencia con Benech-Arnold *et al.* (1995), Romagosa *et al.* (2001) y Corbineau *et al.* (2002). Estos autores encontraron también una reducción en la sensibilidad al ABA y su posible contribución con la ruptura de la dormición. Bajo el régimen de temperaturas alternadas se observó una reducción en el contenido de ABA durante la incubación. Si bien la reducción del contenido endógeno de ABA observado en este experimento y otros experimentos no es de magnitud semejante (Yoshioka *et al.*, 1998; Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Benech-Arnold *et al.*, 2006), la misma podría ser suficiente para explicar el comportamiento diferencial entre las semillas de *C. cardunculus* incubadas bajo temperaturas alternadas y constantes. Probablemente, el contenido estable de ABA observado en semillas incubadas a 20°C sea suficiente para mantener el estado de dormición bajo este régimen. El incremento de la germinación observado en presencia de fluridone (i.e. un inhibidor de la síntesis de ABA) a 20°C (Figura 3.3) sustenta esta posibilidad. La aplicación de GA₃ exógeno en semillas incubadas bajo temperaturas alternadas no se diferenció de aquellas incubadas en presencia de agua. Por otro lado, la adición de GA₃ mejoró la germinación de semillas incubadas a temperatura constante (Figura 3.4). Este resultado mostró que el GA₃ reemplazó los requerimientos de temperaturas alternadas para terminar con la dormición de *Cynara cardunculus*, sugiriendo la síntesis de GAs estaría involucrada en la terminación de la dormición. La importancia de la biosíntesis de GAs para promover la germinación bajo el régimen de 25/15°C se sustenta también en la inhibición profunda de la germinación ejercida por el PCB. Esta inhibición fue revertida completamente por la incubación en una solución combinada de PCB más GA₃. Además, los resultados del análisis de hidrotiempo donde las semillas tratadas con GA₃ a 20°C exhibieron valores de parámetros de hidrotiempo muy similares a aquellos obtenidos en semillas expuestas a 25/15°C, apoya profundamente la proposición de que las GAs estarían involucradas en

este proceso. Los resultados presentados en este capítulo permiten aceptar en la hipótesis II que señalaba que: *la terminación de la dormición en semillas incubadas a temperaturas alternadas es el resultado de una reducción en el contenido endógeno de ABA y/o en la sensibilidad de las semillas al ABA aplicado exógenamente.*

CAPÍTULO 4

EL EFECTO DE LAS TEMPERATURAS ALTERNADAS SOBRE EL BALANCE
ABA: GAs: IDENTIFICACION DE LOS SITIOS DE REGULACION

INTRODUCCIÓN

La exposición de las semillas a las temperaturas alternadas promueve una serie de mecanismos fisiológicos que permiten la terminación de la dormición. En efecto, los experimentos descritos en el capítulo 2 mostraron que las temperaturas alternadas producen un desplazamiento hacia valores más negativos en el valor del $\psi_b(50)$ de la población de semillas. Este resultado tiene una clara implicancia fisiológica, ya que denota que la exposición a temperaturas alternadas incrementa la capacidad del embrión para superar aquellas restricciones que limitan su crecimiento. De todas las especies incluidas en ese estudio, *C. cardunculus* fue la que presentó una reducción más drástica del valor del $\psi_b(50)$. Por lo tanto, se la consideró como un modelo de estudio interesante para comprender los mecanismos involucrados en la terminación de la dormición por efecto de las temperaturas alternadas. Numerosos trabajos sugieren que el incremento en el potencial de crecimiento del embrión tiene una base hormonal, fundamentado en una menor relación ABA/GAs (*e.g.* Leubner-Metzger, 2003). Bajo esta premisa, se consideró la posibilidad de que el efecto de las temperaturas alternadas estuviera mediado por cambios en el balance ABA/GAs. Por este motivo, los experimentos presentados en el capítulo 3 estuvieron dirigidos, en parte, al estudio del contenido y la sensibilidad a la presencia del ABA, en semillas expuestas a temperaturas alternadas y constantes. Los resultados obtenidos demostraron una reducción en el contenido y en la sensibilidad de las semillas al efecto inhibitorio sobre la germinación de esta hormona. Además, mediante la aplicación de ABA y GAs, en forma exógena, y de la utilización de inhibidores de su síntesis (*i.e.* fluridone y paclobutrazol, respectivamente) tanto a temperaturas constantes como alternadas, fue posible modificar artificialmente la relación entre ambas hormonas y observar el comportamiento germinativo bajo cada condición experimental. Los resultados obtenidos señalaron que detrás del efecto estimulante de las temperaturas alternadas parecería haber una reducción en la relación ABA/GAs ya que, tanto la incubación de semillas a temperatura constante en presencia de fluridone o de GA₃ permitía reproducir el efecto de las temperaturas alternadas. Por el contrario, la inhibición de la síntesis de GAs en semillas incubadas bajo temperaturas alternadas, determinó que las semillas se comportaran como si hubieran estado incubadas bajo temperaturas constantes. Tomados en conjunto estos resultados sugieren que las temperaturas alternadas ejercerían su acción mediante una modificación del balance ABA/GAs, no solamente a través de una reducción en el contenido y en la sensibilidad al ABA, sino también por un incremento en la concentración y /o sensibilidad a las GAs. En forma alternativa, se podría considerar que las temperaturas alternadas modifican la relación ABA / GAs a partir de la sola modificación del contenido y la señalización de ABA, sin alterar la síntesis y señalización de GAs. La sensibilidad de las semillas a la aplicación de GAs puede ser estudiada mediante diferentes aproximaciones experimentales: i) a través de la capacidad de las GAs para contrarrestar los efectos inhibitorios sobre la germinación ejercidos por el ABA (Benech-Arnold *et al.*, 2003), o ii) para contrarrestar la acción de compuestos químicos que inhiben su síntesis como por ejemplo el Trinexapac-etilo (TE) (Rademacher, 2000).

El contenido de una hormona resulta del balance dinámico entre dos procesos: el de síntesis y el catabolismo (Umezawa *et al.*, 2006). Por lo tanto, la caída observada en el contenido endógeno del ABA bajo temperaturas alternadas puede estar originada por: un menor ritmo de síntesis, una mayor degradación o por la acción coordinada de ambos procesos. La biosíntesis del ABA esta modulada especialmente por la actividad de la enzima NCED (Schwartz *et al.*, 2003). En *A. thaliana* los miembros de la familia génica

*At*NCED 2-3-5-6 y 9 fueron propuestos como el paso regulatorio clave en la síntesis de esta hormona (Holdsworth *et al.*, 2008). Por su parte, la degradación comprende dos procesos: la hidroxilación en ácido faseico y la conjugación en ABA-glucosil ester (Yamaguchi *et al.*, 2008). La hidroxilación del ABA está modulada por la actividad de la enzima ABA 8-hidroxilasa (Sawada *et al.*, 2008) codificada por la familia de genes *CYP707A* (*CYP707A1-CYP707A4*). En particular, el nivel de expresión de *CYP707A2* es responsable de la degradación rápida del ABA durante la imbibición de semillas de *Arabidopsis*, mientras que en la conjugación del ABA interviene la enzima ABA glucosiltransferasa codificada por el gen *AOG* (Nambara y Marion-Poll, 2005). Medir la expresión de los genes que codifican para NCED y ABA 8-hidroxilasa permitiría determinar si las temperaturas alternadas regulan el contenido endógeno de ABA a nivel de la expresión de estos genes. Por otro lado, la sensibilidad al ABA podría estar regulada también a nivel de la expresión de los genes que codifican para elementos involucrados en la señalización del ABA. Entre esos elementos se encuentran los factores de transcripción ABI3, ABI4 y ABI5, que actúan en la señalización del ABA a través de la inducción de la transcripción de genes que participan en procesos promovidos por ABA (Nambara *et al.*, 2010). No obstante, de los tres elementos mencionados, Lopez-Molina *et al.* (2002) y Chen *et al.* (2008) destacaron la importancia de ABI5, por considerar que ABI5 es el represor último de la germinación al actuar corriente abajo de los otros elementos dentro de ruta de señalización. En forma similar, y de observarse que las temperaturas alternadas estimulan la síntesis de GAs, una regulación que estuviera ejercida a nivel de la transcripción debería reflejarse en un aumento en la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de GAs con actividad biológica (*e.g.* GA 3-oxidasa) (Yamaguchi, 2008). Del mismo modo, si la exposición a temperaturas alternadas aumentara la sensibilidad a las GAs, esto debería verse reflejado en cambios en la expresión de genes que codifican para elementos de su red de señalización, (*i.e.* RGL2, GAI, etc.) (Hartweck, 2008) en la medida en que la regulación sea ejercida a nivel de transcripción.

Los objetivos del presente capítulo son: I) determinar si la modificación del balance ABA/GAs a partir de la cual temperaturas alternadas terminan con la dormición, involucra solo una reducción en el contenido y la sensibilidad al ABA o si, además, incluye el estímulo de la síntesis de GAs y/o un incremento en la sensibilidad a esta hormona; II) determinar si la reducción del contenido de ABA obedece a un cambio en la transcripción de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis (NCED) o en la inactivación (ABA8-hidroxilasa) de esta hormona y III) determinar si un eventual efecto estimulante de las temperaturas alternadas sobre la síntesis de GAs y/o sobre la sensibilidad a esta hormona, es a través de un efecto sobre la transcripción de genes que codifican para alguna enzima clave comprometida en la síntesis de GAs activas (*i.e.* GA 3-beta-hidroxilasa) o para elementos de la cadena de señalización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas

Se recolectaron semillas maduras (*i.e.* al momento de su dispersión natural) de *C. cardunculus* (L.) de dos poblaciones diferentes. Durante enero de 2010 se recolectaron en Azul (Provincia de Buenos Aires 36°47' O, 59° 42' S), mientras que en enero de 2011 se recolectaron en una parcela ubicada en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Católica Argentina (C.A.B.A., 34° 34'O, 58° 26'S). Luego de la limpieza inicial, las semillas se conservaron en bolsas de papel a -18°C para mantener la dormición hasta el comienzo de cada ensayo.

Ensayo de germinación

Para corroborar los requerimientos de temperaturas alternadas para la terminación de la dormición, se condujo con cada lote de semillas un ensayo de germinación durante 14 días en gabinetes de germinación ajustados a temperaturas alternadas (20°C, 12h/10°C, 12h) o a temperaturas constantes (15°C, 24h). Las semillas fueron incubadas en oscuridad en cajas de Petri de 9cm de diámetro cubiertas con film plástico para evitar la evaporación. La germinación se expresó como el porcentaje acumulado y cada valor representó el valor medio \pm EEM de tres repeticiones de 20 semillas cada una. Las semillas con radícula visible mayor a 2mm fueron consideradas como germinadas y removidas de la caja de Petri.

Cuantificación de GAs:

La determinación del contenido de GAs fue realizada sobre el lote de semillas procedentes de Azul recolectadas en 2010. Se incubaron tres repeticiones de 20 semillas cada una bajo temperaturas alternadas (20°C, 12h/10°C, 12h) y constante (15°C) durante 0, 1, 3, 4 y 5 días respectivamente. Se recolectaron de modo individual muestras de embriones aislados quirúrgicamente procedentes de cada tratamiento y repetición. Los embriones se ubicaron dentro de tubos plásticos para micro-centrífuga de 2ml y fueron congelados inmediatamente en N₂ líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de la extracción de GAs. Cuando se encontraron semillas germinadas, éstas no se incluyeron en las muestras para la extracción de GAs. Cada muestra de embriones fue liofilizada, molida en un mortero y pesada. Se les agregó 5 a 6 ml del solvente de extracción, (Metanol (MeOH) 80: H₂O 19: ácido acético (v/v) (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina) (pH=3,0). Luego se agregaron cada uno de los compuestos deuterados [2H₂]-GA1/3/4/8/34 (L. Mander, Australian National University, Adelaide, Australia) y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó cada muestra a 5000 rpm durante 15 minutos y se descartó el pellet vegetal. Posteriormente se agregó entre 5-6 ml de acetato de etilo (Sintorgan) y se particionó manualmente durante 2 minutos separando la fase orgánica; los dos últimos pasos fueron repetidos para finalmente colectar la fase orgánica. La fase orgánica se evaporó a sequedad en un Speed-Vac (155110 System Termo Savant). Se re-disolvió la fase orgánica con MeOH 0.75 a 1 ml (2 veces) y se recolectó en un tubo de micro centrífuga de 2 ml. Luego se evaporó a sequedad y se re-disolvió con 100 µl de MeOH. Finalizada la extracción se inyectaron 10 µl de cada muestra para su posterior identificación en el LC-MS-MS (Cromatógrafo líquido Alliance 2695 (Waters Inc, California, Estados Unidos) acoplado a un doble masas Quattro UltimaTM Pt (Micromass, Manchester, Inglaterra) (FCE-UNRC). La cantidad de cada especie de GA en los extractos, se calculó por comparación del área de los picos obtenidos para los iones parentales para los derivados Me/Me-TMSi de los estándares deuterados internos, y los derivados Me/Me-TMSi de las GA endógenas. Los análisis se hicieron por duplicado (dos inyecciones de cada muestra).

Sensibilidad a GAs

Sobre el lote de semillas recolectadas durante 2011, se evaluó la sensibilidad de las semillas de *C. cardunculus* al GA₃ expuestas a temperaturas alternadas o constantes de incubación. Este estudio incluyó dos aproximaciones diferentes. En ambos estudios, se incubaron tres repeticiones que contenían 20 semillas cada una por tratamiento.

I) Solución combinada TE+ GA₃

Se incubaron semillas en 7ml de una solución combinada 750µM Trinexapac-etilo (TE) (Moddus Syngenta Crop Protection AG, Birsfelden, Suiza) (un inhibidor de la síntesis de GAs, ver capítulo 1) y concentraciones crecientes de GA₃ (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, Kansas, Estados Unidos): 0, 10, 50, 250, 1000 y 1500µM. La concentración de TE usada en este ensayo (250µM) se determinó luego de un ensayo preliminar, en el cual las semillas se expusieron a un rango de TE (0, 125, 250, 500, 750 y 1000µM) bajo temperaturas alternadas (20/10°C) y constantes (15°C). La germinación en presencia de 750 y 1000 µM de TE fue inhibida de manera semejante entre ambos tratamientos térmicos hasta un 15 y 10% (750 y 1000 µM respectivamente).

II) Solución combinada ABA + GA₃

Se incubaron semillas en 7ml de una solución combinada de ABA (250µM) (Phytotechnology Laboratories) y diferentes dosis de GA₃ (10, 50, 250, 1000 y 1.500µM). La concentración de ABA usada en este ensayo (250µM) se determinó luego de un ensayo preliminar, en el cual tres repeticiones de 20 semillas cada una se expusieron a un rango de concentraciones de ABA (0, 50, 100 y 250µM) bajo temperaturas alternadas (20/10°C) y constantes (15°C). Como se mostró en el Capítulo 3, la incubación bajo temperaturas alternadas disminuye la capacidad del ABA de inhibir la germinación. Sin embargo, con concentraciones tan altas como 250µM de ABA la germinación fue inhibida a valores próximos al 15% en ambos tratamientos térmicos.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Del lote de semillas recolectado en Azul durante enero de 2010, se incubaron tres repeticiones de 20 semillas cada una bajo temperaturas alternadas (20/10°C, 12h) y constante (15°C) durante 0, 1, 3 y 5 días respectivamente. Se recolectaron de modo individual, muestras de 15-17 embriones aislados quirúrgicamente procedentes de cada tratamiento y repetición, y fueron congelados inmediatamente en N₂ líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de la extrañación de ácido ribonucleico (RNA). El RNA se extrajo mediante el *mRNA Isolation Kit* (Roche Molecular Biochemicals, GmbH, Mannheim, Alemania). La síntesis de ADN complementario (cDNA) se obtuvo a partir de una cantidad mayor a 10 ng de mRNA por cada muestra mediante *Revert Aid™ M-Mul V Reverse transcriptase system* (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Canadá). La concentración de mRNA se evaluó midiendo la absorbancia a 260 nm mediante un fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen). El RNA fue convertido en cDNA de la siguiente manera: se determinó la concentración de RNA de cada muestra, de acuerdo con su concentración se preparó una solución con 1µl de oligo dT (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) y cantidades variables de agua miliQ y RNA hasta un volumen final de 11µl. Cada muestra fue ubicada en el termociclador durante 5 min a 70°C y 3 minutos a 4°C. Cumplido este tiempo, se agregó 8 µl de una solución compuesta por 4 µl del Buffer de la enzima transcriptasa inversa (RT), 2 µl de dinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 0,5 µl de inhibidor de RNAsas (Fermentas) y 1,5 µl de agua miliQ. Se restableció el termociclador con un periodo de 5 min a 37°C donde se adicionó 1 µl de RT (Fermentas) con las siguientes condiciones desde este momento en adelante 60 minutos a 42°C, 10 minutos a 70°C para reducir finalmente la temperatura a 4°C. El cDNA obtenido fue conservado a -18 °C hasta su uso.

RT-PCR

La cuantificación de transcritos para los genes *NCED*, *CYP707A2*, *ABI5*, *GA3ox*, *GAI* y *RGL2* se evaluó mediante reacciones de RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) semi- cuantitativa. Fueron diseñados un grupo de cebadores (de aquí en adelante se usará el término primers) degenerados a partir de regiones conservadas en secuencias de nucleótidos de otras especies vegetales (Tabla 4.1). Las secuencias utilizadas en el diseño de los pares de primers para *NCED*, fueron las siguientes: DQ173543.1 (Número de acceso del GenBank) (*Rumex palustris NCED9*),

XM002862948.1 (*Arabidopsis lyrata* NCED9), NM106486.2 (*Arabidopsis thaliana*, NCED9), AB120110.1 (*Lactuca sativa*, NCED4). Para CYP707A2 se utilizaron las siguientes secuencias: AB235920.1 (*Lactuca sativa* LsABA8ox4), NM128466.2 (*A. thaliana* CYP707A2), GU559990.1 (*Pronus aviun* CYP707A3), DQ145932.1 (*H. vulgare* subsp. *vulgare* ABA 8'-hidroxilasa 1). Para ABI5 se utilizaron las siguientes secuencias: EU964768.1 (*Zea mays*), NM129185.3 (*A. thaliana*), AB193553.1 (*T. aestivum*), XM002970700.1 (*Selaginella moellendorffii*), AY150676.1 (*H. vulgare* subsp. *Vulgare*). Para GA 3-oxidasa, se utilizaron las siguientes secuencias: AB012205.1 (*Lactuca sativa*), AB303422.1 (*Allium fistulosum*), AB010991.1 (*Solanum lycopersicum*), AB613270.1 (*Torenia fournieri*), AB032198.1 (*Nicotiana tabacum*), DQ641497.1 (*Rumex palustris*), AJ006453.1 (*Cucurbita máxima*). Para GAI se utilizaron las siguientes secuencias: AY781175.1 (*Oryza sativa*), DQ062091.1 (*Sacharum officinarum*), NM101361.2 (*A. thaliana*), EU112606.1 (*Helianthus annuus*). Para RGL2 se utilizaron las siguientes secuencias: NM111216.2 (*A. thaliana*), XM002519168.1 (*Ricinus communis*) y DQ007884.1 (*Malus x domestica*). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: NCED 4 minutos a 94°C; 50seg a 94°C, 1 minuto a 54°C, 1 minuto a 72°C (40 ciclos) y la fase de elongación final a 72°C por 7 minutos. Para ABI5: 4 minutos a 94°C; 50seg a 94°C, 45seg a 55°C, 1 minuto a 72°C (38 ciclos) y la fase de elongación final de 7 minutos a 72°C. Para GA 3-oxidasa: 4 minutos a 94°C, 50seg a 94°C, 50seg a 55°C, 1 minuto a 72°C (37 ciclos) y la fase de elongación final de 7 minutos a 72°C. Para GAI, RGL2 y ABA8ox: 4 minutos a 94°C, 50seg a 94°C, 1 minutos a 50°C, 1 minutos a 72°C (38 ciclos) y la fase de elongación final de 7 minutos a 72°C. Se utilizó el nivel de mRNA de Actina como control interno para normalizar la expresión de los genes de interés. Para este gen, se diseñó un primer específico mediante el OligoPerfect™ Designer (Invitrogen) a partir de una secuencia de *Cynara scolymus* (AM744951.1). Las condiciones de RT-PCR fueron las siguientes: 4 minutos a 94°C (primer ciclo); 50seg a 94°C, 50seg a 55°C, 1 minutos a 72°C (34 ciclos) y la fase de elongación final de 7 minutos a 72°C.

Tabla 4.1 Primers usados para amplificación de cDNA

Gen/ Factor de transcripción	Primer forward (5' a 3')	Primer reverse (5' a 3')	Fragmento amplificado (Pb)
Actina	CCGGTATTGTGCTGGATTCT	GTCAAGAGCGACGTATGCAA	230
NCED	ACRATGATCCAYGAYTTCGC	CAATCKGGTACKTCGATCCA	192
ABA8ox	GGWTACAACCTCCATGCCTYT	ACCTCGAATCTWGAAGGRTC	189
ABI5	GAGATGACNCTBGAGGAGTT	TTCTTGATCATCCTCCTCTG	466
GA3ox	ATGTGGTCYGAAGGNTTCAC	GGACARGCYGGGTAKGAATT	260
GAI	CTCAAGTTCGCYCACTTCAC	GTGMAGCTCGAAMACMGAGT	384
RGL2	GGGCTTAAWCARGGGATGCA	CGGTGRAGCTCRAAWACCGA	290

R = A+G, Y= C+T, N= A+C+G+T, M= A+C y W= A+T

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de Agarosa (1,5%) teñidos con el agente intercalante SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) y observados con UVP Doc-It LS Image Acquisition Software. Se utilizó un marcador molecular de DNA de 100bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU). Los fragmentos amplificados por PCR fueron clonados mediante pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison WI, Estados Unidos). La secuenciación de los fragmentos de DNA se realizó en un ABI PRISM® 377 (Applied Biosystem, Estados Unidos). La secuencia final fue analizada y se comparó su homología con secuencias de proteínas halladas en la base de datos de genes (NCBI) mediante el NCBI BLASTx (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Estas secuencias contenían cDNA con alta similitud a

NCED, ABA8ox, ABI5, GA3ox, GAI y RGL2 de otras especies vegetales y fueron denominadas *CycaNCED*, *CycaCYP707*, *CycaABI5*, *CycaGA3ox*, *CycaGAI*, *CycaRGL2* y *CycaActina* todas a registrarse en el GeneBank. Se estableció la relación entre la intensidad de bandas obtenidas para cada gen con aquella obtenida para idéntico tratamiento térmico y tiempo de incubación para Actina mediante el programa NIH ImageJ. Los resultados muestran los valores medios de 3 repeticiones \pm EEM.

RESULTADOS

Determinación de los requerimientos de temperaturas alternadas para la terminación de la dormición.

Para corroborar los requerimientos de temperaturas alternadas para la terminación de la dormición, se incubaron semillas de *C. cardunculus* a temperaturas de incubación alternadas (20°C, 12h/10°C 12) o constantes (15°C). La exposición de las semillas a temperaturas alternadas incrementó sensiblemente la germinación total ($P=0,0019$) (Figura 4.1). Este efecto promotor se observó a partir del quinto ciclo de alternancia, donde se registró un $20 \pm 10,4$ % (media \pm EEM) bajo 20/10°C y la ausencia de semillas germinadas a 15°C. Al noveno día de incubación, se registraron los acumulados máximos de este test ($81,66 \pm 10,13\%$ y $6,66 \pm 1,66\%$ para 20/10°C y 15°C respectivamente) no observándose nuevas semillas germinadas desde ese día hasta la finalización del estudio (día 14).

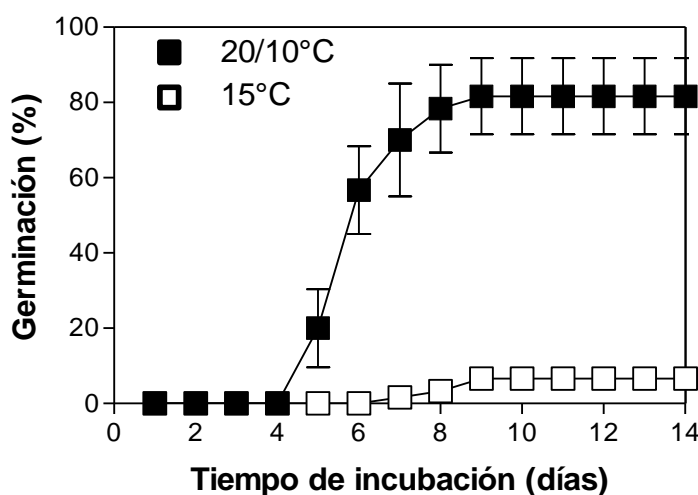


Figura 4.1 Evolución de la germinación en semillas de *C. cardunculus* (lote 2010) incubadas bajo dos diferentes regímenes térmicos. Símbolos llenos representan la germinación observada bajo temperaturas alternadas (20/10°C), mientras que símbolos abiertos representan la germinación a temperaturas constantes (15°C). Los símbolos representan las medias de tres repeticiones y sus respectivos errores estándar. En caso de no mostrarse las barras, el valor del error es menor que el tamaño de los símbolos.

Contenido endógeno de giberelinas durante la incubación

Los contenidos de GA₁ y GA₄ (ng / g de peso seco del embrión) en semillas incubadas a 20/10°C y a 15°C presentaron una dinámica semejante entre ambos tratamientos térmicos a lo largo del periodo de medición (Figura 4.2). En efecto, para GA₁ y GA₄, los dos efectos principales: tiempo de incubación y régimen térmico de incubación y su interacción sobre el contenido de ambas GAs no fueron significativos ($P>0,05$). De la misma manera, para el contenido de GA₈ (catabolito de GA₁) no presentaron diferencias

significativas los dos efectos principales ni su interacción ($P > 0,05$), mientras que no fue posible detectar a GA_{34} (catabolito de GA_4).

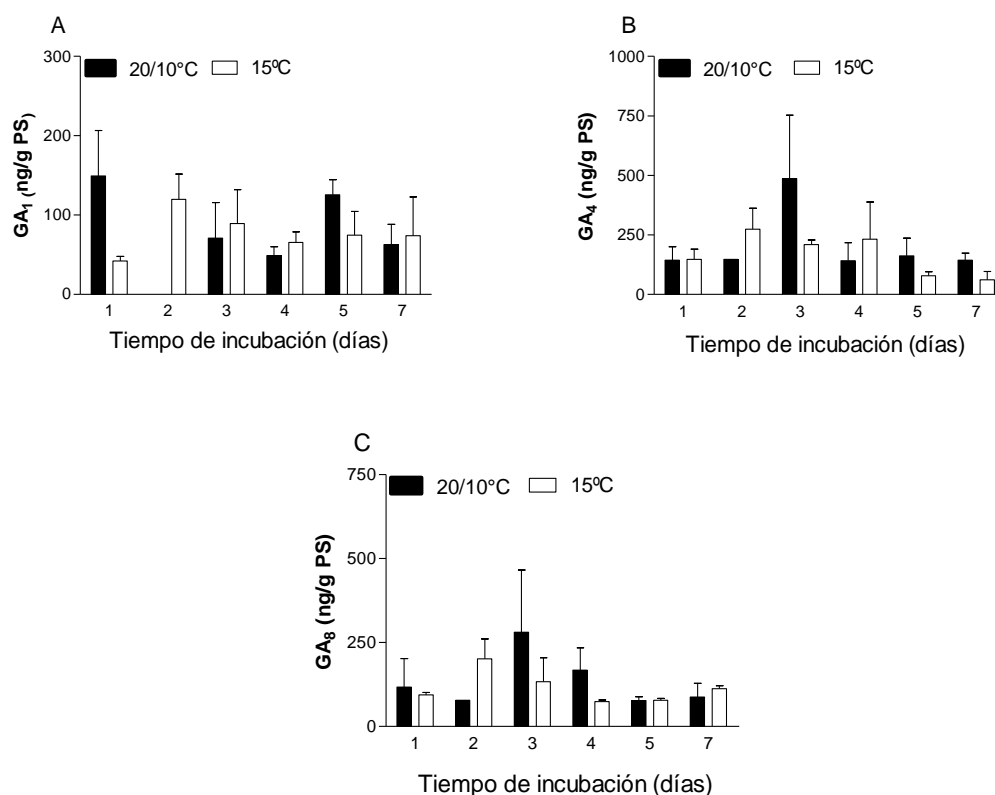


Figura 4.2 Dinámica del contenido endógeno de GA_1 (A), GA_4 (B) y GA_8 (C) en semillas incubadas bajo temperaturas alternadas de 20/10°C (símbolos llenos) o constantes de 15°C (símbolos abiertos). Los valores representan a la media de tres repeticiones y su respectivo error estándar. En caso de no mostrarse las barras, el valor del error es menor que el tamaño de los símbolos. La determinación del contenido de GAs fue realizada mediante LC-MS-MS.

Para corroborar estos resultados, se realizó una segunda determinación sobre el mismo lote de semillas a partir de embriones extraídos en semillas secas y al quinto día de incubación bajo ambos tratamientos térmicos. La elección del quinto día de incubación para la observación del contenido de GAs, obedece a que es el tiempo donde comienzan a expresarse las diferencias de germinación entre temperaturas alternadas vs. temperaturas constantes (ver figura 4.1 o el *inset* en la figura en 4.3). En este test, se cuantificó además el contenido de GA_3 y GA_{34} . No se observó un incremento en el contenido de GAs entre el valor determinado en semillas secas y luego de 5 días de incubación a temperaturas alternadas o constantes ($P = 0,3$, $P = 0,65$, $P = 0,15$, $P = 0,44$ y $P = 0,15$ para GA_1 , GA_3 , GA_4 , GA_8 y GA_{34} respectivamente) (Figura 4.3).

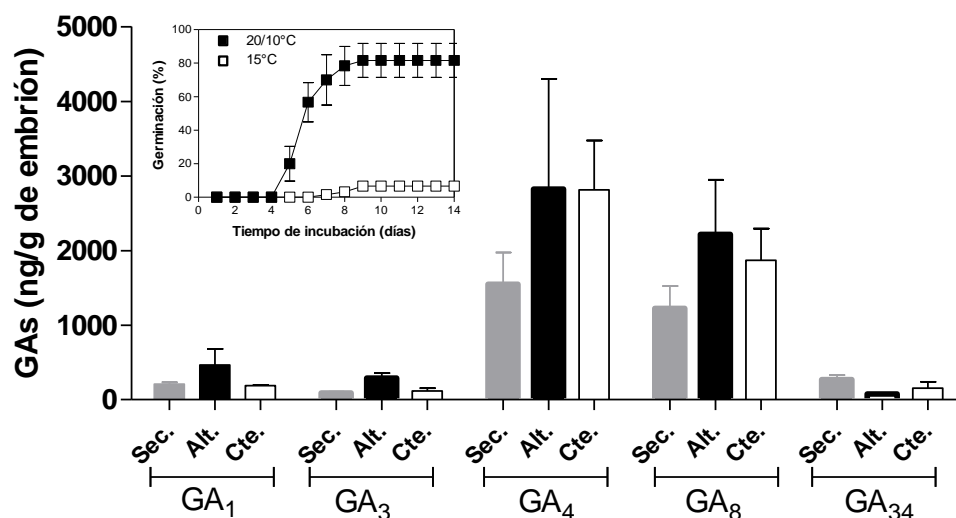


Figura 4.3. Contenido de giberelinas en semillas secas (barras grises) (Sec.) o luego de 5 días de incubación bajo temperaturas alternadas (20/10°C) (barras negras) (Alt.) o constantes (15°C) (barras vacías) (Cte.). Los valores representan a la media de tres repeticiones y su respectivo error estándar. En caso de que no se muestran las barras, el valor del error es menor que el tamaño de los símbolos. El *inset* muestra el resultado del ensayo de germinación realizado en paralelo al muestreo de embriones para la determinación del contenido de GAs. La determinación del contenido de GAs fue realizada mediante LC-MS-MS.

Efecto de las temperaturas alternadas sobre la sensibilidad de las semillas al GA_s

La sensibilidad al GA₃ en semillas incubadas a temperaturas alternadas y constantes se evaluó en 2 ensayos de germinación independientes en un rango de concentraciones crecientes de GA₃. La sensibilidad al GA₃, se determinó mediante su capacidad para revertir el efecto inhibitorio sobre la germinación ejercido por una solución de TE (750 μM) (estudio 1) o de ABA (250 μM) (estudio 2). En el estudio 1, la germinación total en respuesta a la presencia de concentraciones crecientes de GA₃ se incrementó en igual medida en ambos regímenes térmicos (Figura 4.4A).

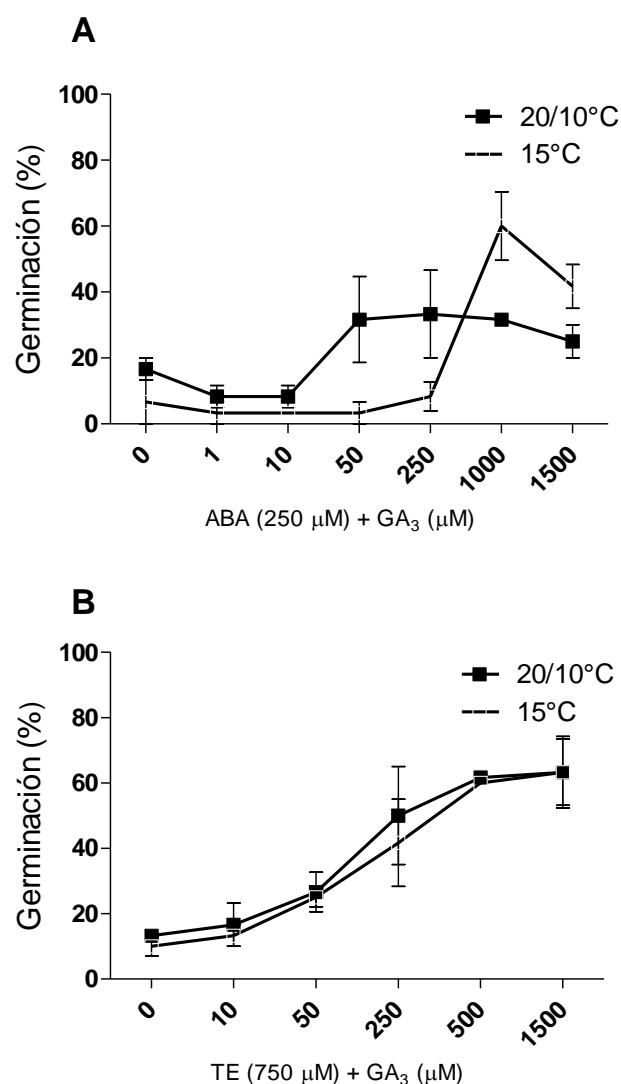


Figura 4.4 A y B. Porcentaje final de germinación en semillas de *Cynara cardunculus* incubadas a temperaturas alternadas (20/10°C) (símbolos cerrados) o a temperatura constante (15°C) (símbolos abiertos) incubadas en diferentes soluciones (ver leyenda por debajo del eje horizontal). Los ensayos de germinación fueron conducidos durante 21 días. Cada símbolo representa el valor promedio de tres repeticiones mientras que las barras verticales representan el error estándar de la media.

En el estudio 2, la germinación total observada en la solución de GA₃ 50 y 250 μ M a temperaturas alternadas superó a la registrada bajo temperaturas constantes (Figura 4.4 B). Sin embargo, estas diferencias excedieron al nivel de significación del 5% ($P=0,14$ y $0,1$ para 50 y 250 μ M respectivamente). Bajo temperaturas alternadas, la concentración de 50 μ M saturó tempranamente la respuesta al GA₃, ya que no se observaron incrementos posteriores en la germinación en respuesta a dosis mayores de esta hormona. Por el contrario, bajo temperaturas constantes, solamente las dosis de 1.000 y 1.500 μ M pudieron revertir la inhibición ejercida por el ABA (250 μ M) incrementando la germinación incluso por encima de la observada bajo temperaturas alternadas. A partir de los resultados obtenidos bajo ambas aproximaciones no se observó un cambio en la sensibilidad a la presencia de GA₃ exógeno entre ambos tratamientos térmicos de incubación.

En línea con los resultados presentados en el capítulo 3, en el experimento preliminar se observó una sensibilidad menor al efecto inhibitorio del ABA para semillas incubadas a temperaturas alternadas (datos no presentados). Para 250 μ M ABA, una dosis 2,5 veces superior a la usada en el capítulo anterior, la germinación fue de $16,67 \pm 3,3$ (media \pm E.E) y de $6,67 \pm 6,67$ para las semillas expuestas a temperaturas alternadas y constantes, respectivamente, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 4.4B).

Análisis bioinformático de secuencias de nucleótidos relacionados con el metabolismo y señalización del ABA y de GAs.

Se diseñaron primers (cebadores) degenerados a partir de secuencias de nucleótidos conservadas de otras especies vegetales (Ver sección Materiales y Métodos). Los fragmentos de cDNA del tamaño esperado para cada gen fueron amplificados. Se realizó el análisis de las secuencias de nucleótidos traducidos a proteínas mediante BLASTx con los siguientes resultados: Para *CycaNCED* el análisis determinó una identidad del 97% (80/82) con NCED2 de *Lactuca sativa* (BAE72991.1), 92% (76/82) con NCED de *Chrysanthemum x morifolium* (BAF36655.1), 92% (76/82) con NCED3 de *Lactuca sativa* (BAE72092.1), 80% (65/81) con NCED3 de *Lilium speciosum* (ACX33873.1) y 81% (67/82) con NCED de *Solanum peruvianum*. Para *CYcaCYP707A2* se observó una identidad de 85% (185/199) con ABA 8'-hidroxilasa de *Lactuca sativa* (BAG12744), 73% (139/196) con CYP707A2 de *Arabidopsis lyrata* (XP002881028.1), 70% (135/196) con ABA 8'-hidroxilasa de *Prunus avium* (ADP08627), 70% (138/196) con ABA 8'-hidroxilasa 2 de *Arabidopsis thaliana* (NP 180473). En *CycaABI5* se observó una identidad del 50% (116/232) con un elemento ABRE de *Solanum tuberosum*, 50% (114/229) con la proteína ABRE de *Solanum lycopersicum*, 67% (31/46) con ABI5 de *Hordeum vulgare* (HQ456390.1), y 50% (114/229) con proteína tipo ABRE de *Solanum lycopersicum* (AAS20434.1). Para *CycaGA3ox*, se observó un 83% (67/80) de identidad con GA3ox de *Chrysanthemum x morifolium* (BAG48320.1), 80% (61/80) con GA3ox1 de *Lactuca sativa* Ls3h1, 6.% (55/81) con GA3ox de *Vitis vinífera* (CAN80137.1), 67% (55/81) GA3ox de *Solanum tuberosum* (ACN89834); 75% (60/81) con GA3ox1 de *Rumex palustris* y 63% (52/82) con GA3ox2 de *Nicotiana tabacum* (ABO70984.1). Para *CYcaGAI* 97% (92/95) de identidad con la proteína tipo GAI de *Tragopogon porrifolius* (ADD64899.1), 93% (88/95) con la proteína tipo GAI de *Argyroxiphium sandwicense* (AAM15889.1), 88% (87/96) con la proteína DELLA de *Malus hupehensis* (ABS50250), 86% (86/96) con la proteína DELLA de *Populus trichocarpa* (XP002302975) y 86% (86/96) con la proteína tipo GAI de *Cayratia japonica* (ABL97859). Para *CYcaRGL2* el análisis bioinformático reveló un 96% (92/95) de identidad con GAI de *Tragopogon porrifolius* (ADD64899), 92% (87/95) con GIA/RGA de *Argyroxiphium sandwicense* (AAM15889), 90% (88/95) con GIA/RGA de *Wilkesia gymnoxiphium* (AAM15886.1), 90% (86/95) con la proteína DELLA de *Solanum lycopersicum* (Q7Y1B6) y 90% (87/95) con GIA/RGA de *Dubautia menziesii* (AAM15884).

Expresión de genes relacionados con el metabolismo y señalización del ABA y de GAs durante la incubación de semillas de C. cardunculus bajo temperaturas alternadas y constantes

Con el propósito de determinar si hay una transcripción diferencial de genes relacionados con el metabolismo y señalización del ABA y de las GAs por efecto de las temperaturas alternadas, fueron analizados los patrones de expresión de los siguientes genes: *CycaNCED*, *CycaCYP707A2* y *CycaABI5* (síntesis, inactivación y señalización de ABA respectivamente), y *CycaGA3ox*, *CycaRGL2* y *CycaGAI* (síntesis de GAs el primero y señalización de GAs los dos restantes).

Las temperaturas alternadas redujeron la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y señalización del ABA. En efecto, las temperaturas alternadas no indujeron la expresión de *CycaNCED* más allá del primer día de incubación (Figura 4.5 A y B). Por el contrario, bajo temperaturas constantes, se observó la expresión de estos genes a lo largo de todo el periodo de evaluación. Las temperaturas alternadas redujeron la expresión de *CycaABI5* en relación con lo observado bajo temperaturas constantes siendo estas diferencias estadísticamente significativas el día 5 de incubación ($P=0,017$) (Figura 4.7A y B). Por el contrario, la expresión de *CycaCYP707A* no fue afectada por el tratamiento térmico de incubación ($P=0,26, 0,92$ y $0,11$, para los días 1, 3 y 5 respectivamente) (Figura 4.6 A y B). La menor abundancia de transcripts observada para los genes que promueven la síntesis de ABA (*CycaNCED*) y la señalización del ABA (*CycaABI5*) en semillas incubadas a temperaturas alternadas son coincidentes con los resultados de la determinación de la dinámica de ABA y del ensayo de sensibilidad a la presencia de ABA presentados en el capítulo 3.

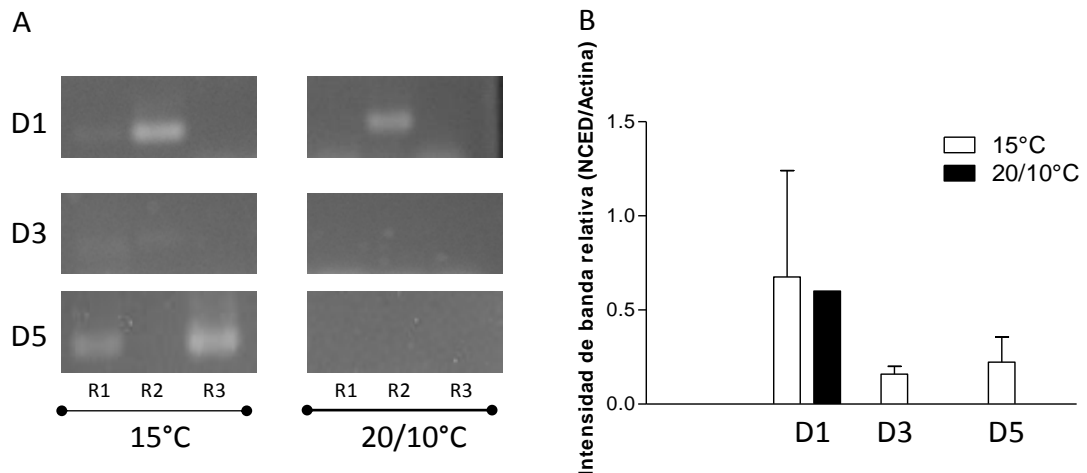


Figura 4.5 A: Acumulación de transcripts de *CycaNCED* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. B: Intensidad de banda de *CycaNCED* en relación con la observada para Actina. Se muestran los valores de tres repeticiones (R1 –R3) por tratamiento \pm EEM.

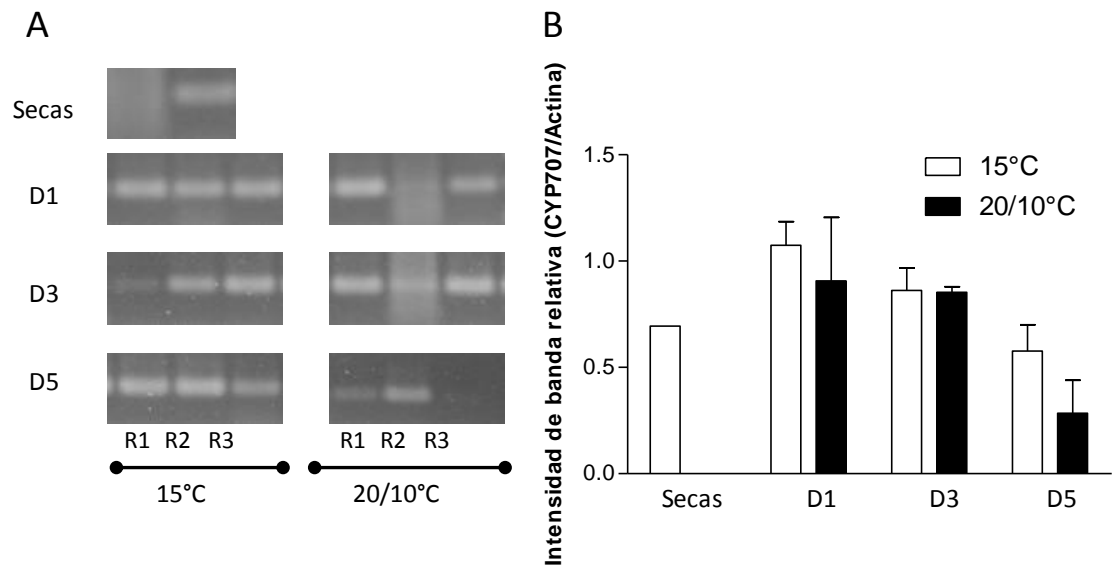


Figura 4.6 A: Acumulación de transcritos de *CycaCYP707A* de embriones aislados de achenios con tiempo de incubación 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. Las reacciones de RT-PCR se desarrollaron de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. B: Intensidad de banda de *CycaCYP707A* en relación con la observada para Actina. Se muestran los valores de tres repeticiones (R1 – R3) por tratamiento \pm EEM.

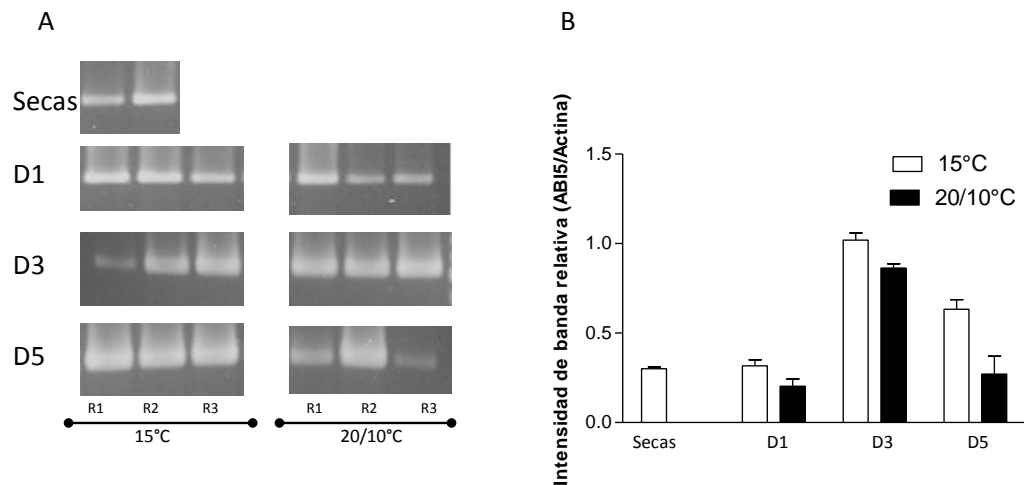


Figura 4.7 A: Acumulación de transcritos de *CycaABI5* de embriones aislados de achenios con tiempo de incubación 0 (Secas), 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. Las reacciones de RT-PCR se desarrollaron de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. B: Intensidad de banda de *CycaABI5* en relación con la observada para Actina. Se muestran los valores de tres repeticiones (R1 – R3) por tratamiento \pm EEM.

Por el contrario, las temperaturas alternadas no produjeron modificaciones en la expresión de los genes vinculados con el metabolismo (*CycaGA3ox*) y señalización de las GAs (*CycaRGL2* y *CycaGAI*) con respecto a la observada bajo temperatura constante (Figura 4.8, 4.9 y 4.10). La expresión de transcritos para *CycaGA3ox* detectada a partir del día 3 de incubación, fue similar entre ambos tratamientos térmicos ($P = 0,20$ y $0,77$ para los días 3 y 5 respectivamente) (Figura 4.8 A y B). Para *CycaRGL2*, el nivel de expresión observado los días 1, 3 y 5 fue similar entre ambos

tratamientos térmicos ($P = 0,26$, $0,07$ y $0,34$ respectivamente) (Figura 4.9 A y B). Para *CycaGAI*, no hubo diferencias en la expresión de las muestras procedentes de temperaturas alternadas o constantes ($P = 0,15$ y $0,97$, para los días 1 y 5 respectivamente) (Figura 4.10).

La abundancia similar en la cantidad de transcritos medidos para los genes relacionados con la síntesis de GAs (*CycaGA3ox*) y la señalización de las GAs (*CycaRGL2* y *CycaGAI*) bajo temperaturas alternadas y constantes fueron consistentes con los resultados fisiológicos presentados en este capítulo donde no se observaron cambios en el contenido de GAs o en la sensibilidad.

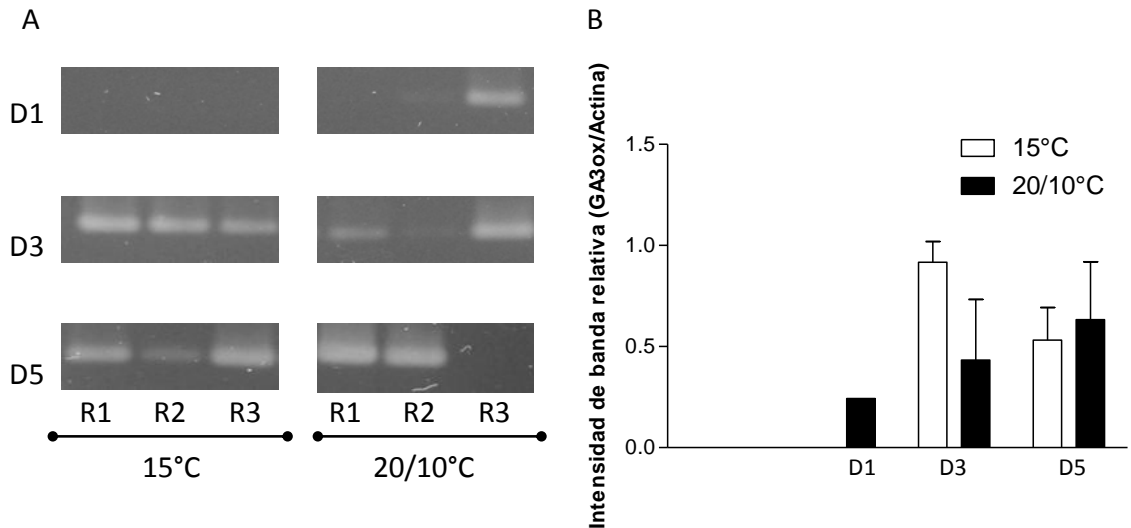


Figura 4.8 A: Acumulación de transcritos de *CycaGA3ox* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. Las reacciones de RT-PCR se desarrollaron de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. B: Intensidad de banda de *CycaGA3ox* en relación con la observada para Actina. Se muestran los valores de tres repeticiones (R1-R3) por tratamiento \pm EEM.

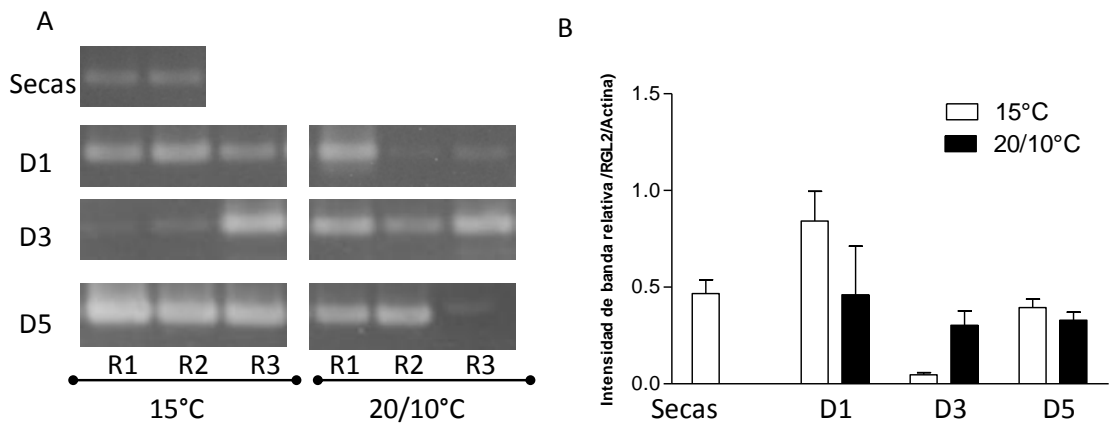


Figura 4.9 A: Acumulación de transcritos de *CycaRGL2* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 0 (Secas), 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. Las reacciones de RT-PCR se desarrollaron de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. B: Intensidad de banda de *CycaRGL2* en relación con la observada para Actina. Se muestran los valores de dos repeticiones para las semillas secas y de tres repeticiones (R1-R3) por tratamiento \pm EEM para el resto de las observaciones.

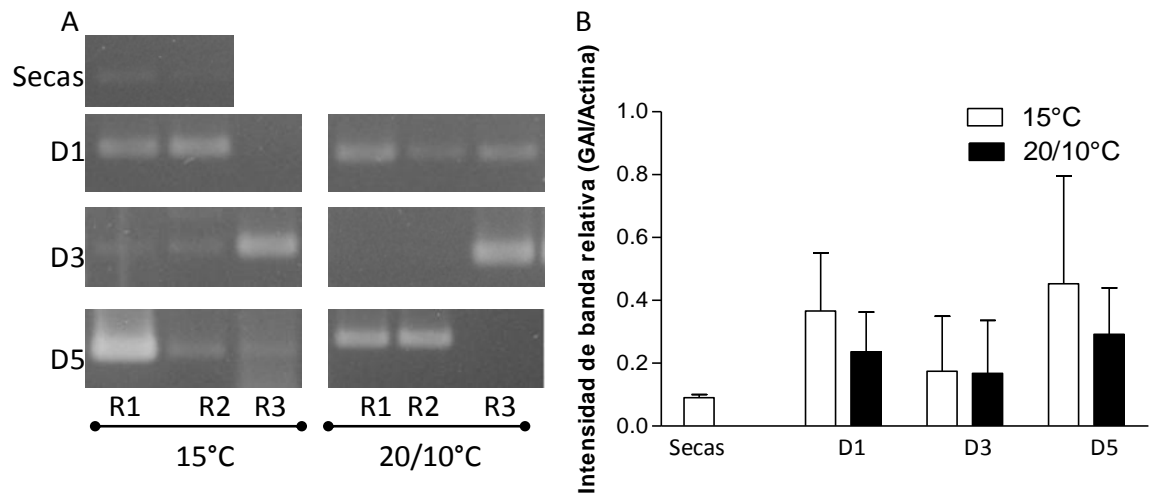


Figura 4.10 A: Acumulación de transcritos de *CycaGAI* de embriones aislados de aquenios con tiempo de incubación 0 (Secas), 1 (D1), 3 (D3) y 5 (D5) días bajo temperaturas constantes de 15°C o temperaturas alternadas de 20/10°C. Las reacciones de RT-PCR se desarrollaron de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. B: Intensidad de banda de *CycaGAI* en relación con la observada para Actina. Se muestran los valores de dos repeticiones para las semillas secas y de tres repeticiones (R1-R3) por tratamiento \pm EEM para el resto de las observaciones.

DISCUSIÓN

Se ha propuesto que la terminación de la dormición involucra cambios en los niveles hormonales (*i.e.* menor relación ABA / GAs) como en la sensibilidad a la acción de estas hormonas (*i.e.* mayor sensibilidad a las GAs y menor sensibilidad al ABA) (Kucera *et al.*, 2005; Finkelstein *et al.*, 2008; Graeber *et al.*, 2012). Si bien diversos trabajos muestran cambios en los niveles y sensibilidad a estas hormonas en respuesta a tratamientos que terminan la dormición (Toyomasu *et al.* 1993, 1998; Sawada *et al.*, 2008), no habían sido estudiados de manera detallada la participación de cada uno de estos aspectos del balance hormonal en relación al efecto de las temperaturas alternadas. Del mismo modo, tampoco se habían identificado cuales son los posibles sitios de regulación a nivel molecular de estos mecanismos. A partir de los resultados presentados en el capítulo 3, se observó que las temperaturas alternadas redujeron el contenido de ABA y la sensibilidad al ABA. Ambos resultados fueron corroborados posteriormente por los estudios de expresión de genes, donde se encontró que la exposición de las semillas a temperaturas alternadas regula hacia abajo la expresión de *CycaNCED* y *CycaABI5*, mientras que no se observaron cambios en la expresión de *CycaCYP707A* entre temperaturas alternadas y temperaturas constantes (Figuras 4.5 a 4.7). Estos resultados permiten proponer que la transcripción de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis y en la señalización de ABA como los sitios a nivel de los cuales las temperaturas alternadas regulan el contenido y la señalización de esta hormona con el consiguiente efecto sobre la terminación de la dormición. Estos resultados se alinean con los obtenidos por Argyris *et al.* (2008) y Toh *et al.* (2008) quienes propusieron que la temperatura controla la germinación de semillas de *Lactuca sativa* a través de la regulación de la expresión de genes que participan en la biosíntesis del ABA. En efecto, como en esta tesis, Argyris *et al.* (2008) también hallaron una reducción en el nivel de expresión de *LsNCED4* y de *ABI5* en semillas expuestas a la temperatura que permite la germinación. Por el contrario, no encontraron cambios en la expresión de *LsABA8ox4*, bajo aquellas temperaturas que permitían la germinación y aquellas que la inhibían. Por su parte, Toh *et al.* (2008), hallaron que tanto el gen que codifica para la zeaxantina epoxidasa (*ABA1/ZEP*) y el gen *NCED9*, ambos participantes del proceso de biosíntesis del ABA, fueron regulados negativamente bajo temperaturas que permitieron la germinación de *A. thaliana*,

Si bien la reducción en el contenido de ABA bajo temperaturas alternadas, es coincidente con lo ya conocido para otros factores terminadores de la dormición, como la luz y los nitratos, no siempre el sitio de regulación se encuentra vinculado con una reducción de la tasa de síntesis de esta hormona. En efecto, en semillas expuestas a la luz, Sawada *et al.* (2008) reportaron que son dos los sitios de regulación para el control del contenido de ABA. Los autores informaron que la expresión de los genes *LsNCED2* y *LsNCED4*, involucrados en la síntesis de ABA, fue regulada hacia abajo mientras que la expresión del gen *LsABA8ox4*, involucrado en la degradación del ABA, se incrementó. Por su parte, el sitio de regulación del contenido de ABA tras la aplicación de nitratos en semillas de *Arabidopsis*, se encuentra asociado a un incremento en la expresión de *CYP707A2*, un gen responsable de la síntesis de la enzima que participa de la degradación del ABA (Matakiadis *et al.*, 2009). Como fue señalado, las temperaturas alternadas provocaron también una regulación hacia abajo de la expresión de *CycaABI5*, desde el día 3 en adelante. *ABI5* es un factor de transcripción de tipo bZIP y es un regulador positivo de la señalización de ABA (Lopez-Molina *et al.*, 2002). La menor expresión del gen que codifica para esta proteína en semillas expuestas a temperaturas

alternadas, podría estar determinando una menor abundancia de la proteína lo que resultaría en una menor sensibilidad a la acción inhibitoria del ABA. Este resultado concuerda con los resultados fisiológicos presentados en el capítulo 3 donde las temperaturas alternadas reducen la sensibilidad al ABA y sostienen la Hipótesis V planteada en el capítulo introductorio. La sensibilidad al efecto del ABA se encuentra relacionada con el contenido de ABI5, existiendo una relación estrecha entre el contenido de esta hormona y el de la proteína ABI5 (López-Molina *et al.*, 2001). Por lo tanto, aquellas señales ambientales que deriven en una reducción del contenido de ABA (*i.e.* luz y nitratos) reducirían la expresión de ABI5. No obstante, la cantidad y estabilidad de ABI5 no solamente está modulada por el contenido de ABA. En efecto, López-Molina *et al.* (2003) y Stone *et al.* (2006) reportaron respectivamente, que las proteínas AFP (proteína ligada a ABI 5) y KEG (Keep On Going) marcan al ABI5 para su posterior degradación por acción del sistema ubiquitina-proteosoma. Recientemente, Foley *et al.* (2012) estudiaron el transcriptoma de semillas de *Euphorbia esula* expuestas a temperaturas alternadas y constantes. Entre otros hallazgos, los autores encontraron un incremento en la transcripción de ABI3 y ABI5 tres días después de la imbibición bajo temperaturas alternadas. Para ese tiempo, las semillas de *E. esula* se encuentran todavía distantes del comienzo de la germinación (Foley y Chao, 2008). Dicho trabajo no incluye el estudio de cambios transcripcionales en momentos más cercanos a la germinación que permitan una comparación más directa con los resultados aquí presentados. ABI3 es un elemento de la señalización del ABA ubicado corriente arriba de ABI5.

En el capítulo 3 se observó, además, de qué manera la manipulación del balance hormonal de las semillas, mediante la aplicación de ABA, GAs y de los respectivos inhibidores de su síntesis, bajo temperaturas alternadas o constantes modificaron el comportamiento germinativo de las semillas (Figuras 3.2 y 3.4). Estos estudios señalaron que aquellas condiciones experimentales que establecían una menor relación ABA/GAs eran tan eficaces en la terminación de la dormición como las temperaturas alternadas. Sin embargo, la información disponible hasta esa instancia era insuficiente para establecer cuál era la participación específica de las GAs en la respuesta a las temperaturas alternadas. Para poder esclarecer su rol, en este capítulo se estudió si la terminación de la dormición por efecto de las temperaturas alternadas incluye: I) el estímulo de la síntesis de GAs y/o II) un incremento en la sensibilidad a esta hormona; Los resultados obtenidos establecieron contenidos semejantes de GA₁ o GA₄ para las semillas incubadas bajo temperaturas o las incubadas bajo temperaturas constantes (Figura 4.2 y 4.3), denotando, bajo las condiciones experimentales utilizadas, que la síntesis de GAs se encuentra activa en semillas incubadas bajo ambos regímenes térmicos. Este resultado en conjunto con los obtenidos en la cuantificación del ABA (Figura 3. 3) y los inhibidores GAs y ABA (paclobutrazol y fluridone respectivamente) (Figura 3.2 y 3.4) muestran la naturaleza hormonal de la respuesta a las temperaturas alternadas. Bajo temperaturas constantes, el mecanismo que mantiene la dormición es la continua síntesis de ABA durante la incubación (*i.e.* alto ABA / GAs). Por lo tanto, la aplicación de fluridone impidió la síntesis del ABA y en consecuencia redujo la relación ABA / GAs, ya que la síntesis de GAs se encuentra activa independientemente del régimen térmico. De esta manera, las semillas expuestas a temperaturas constantes se comportaron como si hubiesen estado bajo temperaturas alternadas. Las temperaturas alternadas reducen el contenido de ABA sin afectar la síntesis de GAs, estableciendo una baja relación ABA: GAs que permite la terminación de la dormición. En este caso, la presencia del paclobutrazol redujo el contenido de GAs con actividad biológica,

estableciendo de esta manera una relación alta entre ambas hormonas. De este modo, semillas incubadas bajo temperaturas alternadas terminaron comportándose como si hubieran estado incubadas a temperaturas constantes. En cada uno de estos contextos, la síntesis de GAs *de novo* parecería ser un requisito para que la germinación proceda.

La determinación del contenido de GAs bajo ambos tratamientos térmicos estuvo de acuerdo con el análisis de la expresión de *CycaGA3ox*, donde se observó un nivel de transcritos semejante en semillas incubadas bajo temperaturas alternadas y constantes (Figura 4.8). La elección de la expresión del gen que codifica para esta enzima, obedeció a que la actividad de la GA 3-oxidasa es el paso último para la conversión hacia las formas bio-activas de este compuesto (Yamaguchi, 2008).

Por otro lado las temperaturas alternadas tampoco modificaron la sensibilidad de las semillas al GA₃ exógeno cuando se reprimió la síntesis de GAs mediante TE. En efecto, la germinación total dentro del rango de concentraciones de GA₃ estudiadas, denotó un comportamiento similar entre ambos regímenes térmicos. En contraste, en dos de las concentraciones de GA₃ utilizadas (50 y 250μM), el uso de soluciones combinadas de ABA más GA₃, se observó un sutil incremento de la germinación en semillas incubadas a temperaturas alternadas con respecto a lo observado bajo temperaturas constantes (Figura 4.4 A y B). No obstante, considerados en su conjunto los resultados alcanzados no permiten suponer que el incremento en la sensibilidad a las GAs sea uno de los mecanismos fisiológicos a partir de los cuales las temperaturas alternadas terminan la dormición. La ausencia de un incremento en el contenido o de una mayor sensibilidad a las GAs no permite aceptar lo planteado por la hipótesis III de la Introducción General. Nuevamente, fueron consistentes los resultados de las aproximaciones fisiológicas y las moleculares en relación con la sensibilidad a las GAs. En efecto, las temperaturas alternadas no modificaron la expresión de genes que codifican para reguladores negativos de la señalización de GAs como son las proteínas GAI o RGL2 (Figura 4.9 y 4.10). De este modo, se acepta la Hipótesis VII que expresaba que “*La incubación de semillas bajo alternancia de temperaturas no induce la expresión de ciertos genes que regulan negativamente la señalización de GAs (e.g. GAI, RGL2)*”.

La figura 4.11 resume los cambios en el contenido y señalización hormonal y del nivel de transcritos posiblemente involucrados en la síntesis, catabolismo y señalización en relación con los tratamientos térmicos y hormonales aplicados.

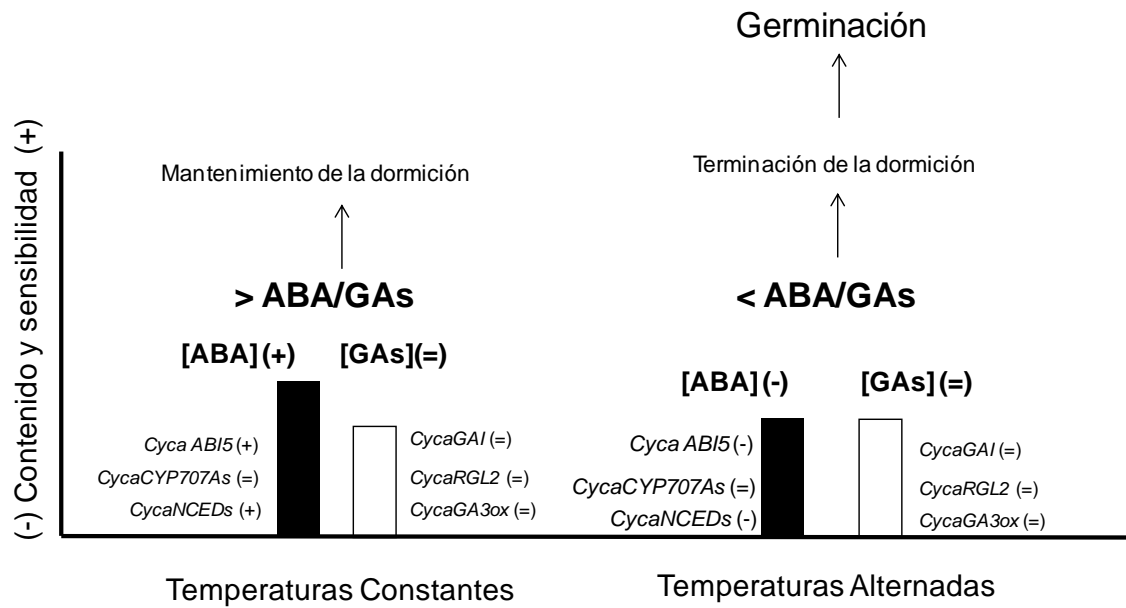


Figura 4.11 La altura de cada columna representa los contenidos relativos de ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GAs). El incremento en la concentración [] y la regulación positiva de la transcripción están indicada con un (+), la disminución de la concentración y la regulación negativa por un (-), mientras que (=) representa sin cambios concentraciones o nivel de transcritos entre temperaturas alternadas y constantes

CAPITULO 5

DISCUSION GENERAL

DISCUSION GENERAL

La identificación de las temperaturas alternadas como un factor terminador de la dormición fue enunciada décadas atrás por Steinbauer y Grigsby (1957). Desde ese momento hasta el presente, existe un consenso sólido acerca de que, en conjunto con la luz y los nitratos son las señales ambientales más relevantes para la terminación de la dormición (Penfield y King, 2009; Footitt *et al.*, 2011; Finch-Savage y Footitt, 2012). Así, en el caso de las semillas que se encuentran enterradas en el banco de semillas del suelo, la percepción de fluctuaciones térmicas es una señal ambiental que aporta información acerca de la ubicación espacial de las semillas (Thompson y Grime, 1983; Ghera *et al.*, 1992). Hasta el inicio de la presente tesis, el conocimiento sobre el efecto de las temperaturas alternadas en la terminación de la dormición avanzó en especial sobre dos diferentes ejes: las características constitutivas del ciclo de alternancia de mayor eficacia para la terminación de la dormición (*e.g.* Roberts y Totterdell, 1981; Murdoch *et al.*, 1989; Benech-Arnold *et al.*, 1990a, b; Batlla *et al.*, 2003) y sobre el sentido adaptativo de este requerimiento (*e.g.* Benech-Arnold *et al.*, 1988; Ghera *et al.*, 1992). Para el primero de estos aspectos, se identificó al número de ciclos y a la amplitud térmica como dos de las características de los ciclos de alternancia de temperaturas, con mayor relevancia (ver capítulo 1). Por otro lado, los resultados presentados en el segundo grupo de trabajos permiten concluir que la percepción de temperaturas alternadas le confiere a las poblaciones de semillas la posibilidad de detectar la profundidad de entierro y la existencia de discontinuidades en el dosel vegetal. El conocimiento existente sobre el requerimiento de temperaturas alternadas de muchas poblaciones de malezas se utilizó para el diseño de estrategias de conducción de cultivos basadas en la prevención de la satisfacción de este requerimiento. Por este medio, se redujo la emergencia de plántulas y en forma concomitante su crecimiento poblacional (Huarte y Benech-Arnold, 2003). Independientemente de los avances realizados, es escasa la información disponible en la literatura que permitan la comprensión de las bases fisiológicas, hormonales y moleculares de la respuesta a las temperaturas alternadas (Hu *et al.*, 2012).

En Tesis utilizó como punto de partida la comparación de los parámetros resultantes de la aplicación del modelo de hidrotiempo (Gummerson, 1986) en un grupo de especies no domesticadas. El modelo de hidrotiempo, en conjunto con otros modelos de base poblacional, permite caracterizar, cuantificar y modelar satisfactoriamente la dormición y el comportamiento germinativo de semillas en respuesta a factores ambientales y fisiológicos (Allen *et al.*, 2008; Boddy *et al.*, 2012). Varios autores destacaron la fortaleza de los modelos de base poblacional, ya que el valor de sus parámetros tiene una profunda significancia biológica, y en especial, el valor del potencial agua base (ψ_b), (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Bradford *et al.*, 2008; Watt *et al.*, 2011). La aplicación del modelo de hidrotiempo sobre los resultados obtenidos en ensayos de germinación bajo temperaturas alternadas y constantes, mostró que las temperaturas alternadas redujeron el ψ_b de germinación en todas las especies estudiadas (capítulo 2). Desde un punto de vista fisiológico, este hecho significa un incremento en la capacidad del embrión para superar aquellas restricciones de origen físico y/o endógeno que impiden su crecimiento (Welbaum *et al.*, 1998). Por lo tanto, esta afirmación constituye la primera explicación fisiológica sobre el origen de la respuesta a las temperaturas alternadas. Del grupo inicial de especies estudiadas, *Cynara cardunculus* fue la que mostró una reducción mayor en el valor del ψ_b . Por esa razón, los experimentos posteriores se centraron en esta especie. Como fuera expresado, el efecto de las

temperaturas alternadas se relaciona con un incremento de la capacidad del embrión para sobreponerse al conjunto de restricciones que impiden su crecimiento.

Tal como lo descrito para otras especies Asteráceas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006), *C. cardunculus* presenta dormición de tipo fisiológico no profundo. En esta familia el embrión se encuentra recubierto completamente por un endosperma delgado y un pericarpio grueso siendo ambos tejidos considerados como las resistencias físicas que el embrión debe superar para que la germinación concluya (Sung *et al.*, 2008). La finalización de la dormición de tipo fisiológica, requiere de un incremento de la relación de fuerzas entre el potencial de crecimiento del embrión *versus* las restricciones impuestas por los tejidos extraembrionarios (*e.g.* endosperma, pericarpio) (Nonogaki, 2006). Si bien no fue propósito de esta tesis identificar, mediante experimentos específicos, cuál de los sitios responsables de alterar el balance de fuerzas (*i.e.* embrión y/o cubiertas) es influido por las temperaturas alternadas, se observó que el aislamiento de los embriones de *C. cardunculus* permite una germinación rápida (Huarte, datos no presentados). Una vez aislados, los embriones permanecen rodeados por el endosperma, indicando de esta manera que el bloqueo sobre la germinación se ubica a nivel del pericarpio. Por lo tanto, la reducción del ψ_b ejercida por las temperaturas alternadas es posible asociarla con un incremento en el potencial de crecimiento del embrión permitiendo que la germinación ocurra.

El incremento del potencial de crecimiento del embrión puede ser asociado a una reducción del potencial agua del embrión, causado probablemente por la acumulación de azúcares y aminoácidos (Bewley, 1997), pero también por una mayor extensibilidad de las paredes celulares del eje embrionario (Nonogaki *et al.*, 1998). Este proceso, como el debilitamiento del endosperma, involucra la acción de proteínas que remodelan sus paredes celulares (CWRPs) (Linkies y Leubner-Metzger, 2012). La participación de las CWRPs fue estudiada en especies de diferentes familias incluyendo a las Asteráceas (Dutta *et al.*, 1997; Nascimento *et al.*, 1999). La síntesis de las CWRPs se encuentra principalmente regulada por la acción hormonal (Hilhorst *et al.*, 2010). Dentro de las hormonas que participan de este proceso, los roles de las GAs y del ABA son los más conocidos, donde las GAs cumplen la función de estimular su síntesis mientras que el ABA la reprime (da Silva *et al.*, 2004; Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). En ese contexto, el incremento del potencial de crecimiento del embrión mediado por las temperaturas alternadas debería verse asociado con I) una reducción en el contenido de ABA (menor síntesis y/o mayor catabolismo) (Nambara y Marion-Poll, 2005) y/o en la sensibilidad al efecto inhibitorio de la germinación de este regulador del crecimiento (Corbineau *et al.*, 2002), y II) con un mayor contenido de GAs (mayor síntesis y/o menor catabolismo) (Yamaguchi, 2008) y/o sensibilidad al efecto promotor de la germinación de las GAs (Hartweck, 2008). Con la intención de identificar cuál de los posibles cambios en las relaciones hormonales era responsable del incremento del potencial de crecimiento del embrión y la posterior terminación de la dormición, se exploró una eventual modificación en los niveles endógenos de ABA y GAs y/o en la sensibilidad de las semillas al agregado de estas fitohormonas (capítulos 3 y 4). Los resultados del capítulo 3 mostraron que las temperaturas alternadas reducen el contenido endógeno de ABA (Figura 3.3), y la sensibilidad de las semillas a su efecto inhibitorio sobre la germinación (Figura 3.2). Ambas observaciones fueron posteriormente corroboradas por los estudios de expresión de genes, en los cuales se observó una reducción en el nivel de transcritos que codifican para NCED y ABI5 (capítulo 4). Si bien la reducción en el contenido (*e.g.* Sawada *et al.*, 2008) y/o en la sensibilidad al ABA (*e.g.* Corbineau *et al.*, 2002) son

requisitos conocidos para la terminación de la dormición bajo otros tratamientos, este es el primer estudio donde se demuestra que la respuesta a las temperaturas alternadas se asocia con estos cambios. Por el contrario, las temperaturas de incubación constantes determinaron que la concentración de ABA permaneciera constante durante el período de incubación. El hecho de que una síntesis *de novo* de ABA durante la incubación (y, concomitantemente, el mantenimiento del contenido de ABA), sea la responsable del mantenimiento de la dormición bajo temperaturas constantes se alinea con lo observado entre otros autores por Le Page-Degivry y Garello (1992), Ali-Rachedi *et al.* (2004). En el capítulo 4 se estudió si la respuesta a las temperaturas alternadas implicaba además un incremento en el contenido y/o en la sensibilidad a las GAs. Los resultados obtenidos, señalaron que la respuesta a las temperaturas alternadas no se relacionó con un incremento en la síntesis o en una menor inactivación de las GAs, ni con una mayor sensibilidad a su efecto promotor sobre la germinación. En efecto, la acumulación de GAs activas fue similar en semillas incubadas a temperaturas alternadas o constantes en todos los momentos de la incubación, incluyendo el inicio de la germinación de aquellas semillas incubadas bajo temperaturas alternadas (Figura 4.3). Estos resultados también fueron corroborados por estudios moleculares (capítulo 4), en los cuales se observó una cantidad de trascriptos común para elementos que participan en la síntesis y en la señalización de las GAs. Por lo tanto, el conjunto de experimentos realizados permitió hallar que la terminación de la dormición por efecto de las temperaturas alternadas es de naturaleza hormonal fundamentada es una reducción de la relación ABA / GAs, reduciendo concomitantemente la expresión de genes que codifican para elementos de la red de señalización del ABA (*i.e.* *CycaABI5*). La baja relación ABA / GAs y la reducción en el nivel de mRNA de *ABI5* por efecto de las temperaturas alternadas son consistentes con las condiciones requeridas para la síntesis de las CWRPs necesarias para estimular el crecimiento del embrión y cuyo efecto se observa en la reducción del ψ_b (capítulo 2).

Si bien no estuvo comprendido dentro de los alcances de la presente tesis, no podría descartarse que otra/s hormonas o compuestos químicos como las especies reactivas al oxígeno (ROS) participen en la respuesta a las temperaturas alternadas. Al presente, está documentada la participación del etileno en la terminación de la dormición mediante la represión de la señalización del ABA (*i.e.* *ABI1*, 2) (Kucera *et al.*, 2005; Matilla y Matilla-Vazquez, 2008; Linkies *et al.*, 2011) tal como lo observado en semillas expuestas a las temperaturas alternadas. Si bien en la presente tesis la señalización del ABA fue estudiada sobre el factor de transcripción *ABI5*, es posible que las temperaturas alternadas depriman la señalización de esta hormona corriente arriba del elemento estudiado. Bajo este supuesto podría ser considerado que las temperaturas alternadas podrían estimular la síntesis de etileno, tal como observó Argyris *et al.* (2008), en semillas de *L. sativa* bajo temperaturas que permitieron la germinación. En dicho estudio, los autores observaron un incremento en la expresión del gen *ACO-B* que integra la familia génica que codifica para la ACC oxidasa, la enzima que promueve el paso final de la síntesis del etileno. Por su parte Muller *et al.* (2009), señalaron que la síntesis de compuestos ROS se encuentra bajo control hormonal y que uno de estos compuestos, el anión hidróxido, participa de la degradación de paredes celulares necesarias para la crecimiento de la radícula.

El esquema siguiente resume los conocimientos aportados por los capítulos II, III y IV sobre la naturaleza hormonal de la terminación de la dormición por efecto de las

temperaturas alternadas. Se destacan los procesos principales que estarían siendo regulados por las temperaturas alternadas de incubación.

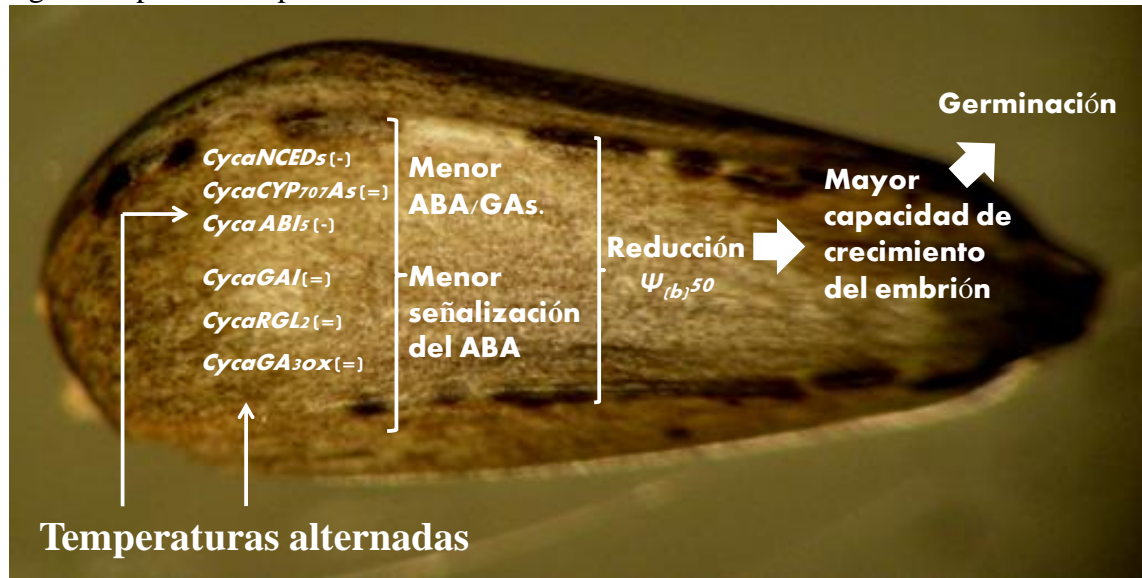


Figura 5.1 Procesos involucrados en la terminación de la dormición por temperaturas alternadas. El símbolo (+) representa un incremento de la expresión de genes en relación a la detectada bajo temperaturas constantes. El símbolo (=) representa que no se detectaron cambios en la expresión bajo ambos tratamientos térmicos, mientras que (-) indica una reducción en la expresión en relación a la observada bajo temperaturas constantes.

Otro aporte de este trabajo fue la obtención para su publicación en NCBI de las secuencias codificantes (CDS) para *C. cardunculus* de los seis transcritos anteriormente mencionados y el de la actina, gen cuya expresión se usó como referencia.

Una vez descritos el conjunto de procesos activados por las temperaturas alternadas, es interesante analizar la existencia de mecanismos análogos entre la terminación de la dormición por efecto de la luz y aquellos promovidos por las temperaturas alternadas en especies con dormición de tipo fisiológico no profundo. La comparación del efecto de ambas señales ambientales denota que la respuesta fisiológica es común, ya que bajo la influencia de la luz o las temperaturas alternadas se observa un incremento de la capacidad de crecimiento del embrión. En efecto para el caso de la luz, entre otros estudios, de Miguel y Sánchez (1992) informaron que el efecto sobre la terminación de la dormición radica en un incremento del potencial de crecimiento del embrión y un debilitamiento del endosperma. Como fue mencionado, ambos procesos tienen una base hormonal (Leubner Metzger, 2003; Graeber *et al.*, 2012). No obstante, en las especies usadas como modelo para estudiar la respuesta a la luz, se observó que los metabolismos, tanto en la síntesis como en su inactivación, de las GAs y del ABA son modulados por el fitocromo. Estas observaciones son consistentes con la expresión de aquellos genes que codifican para las enzimas responsables de la síntesis, degradación y de señalización de estas hormonas (e.g. Seo *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 1998; Yamauchi *et al.* 2004). En particular, es conocido que la forma activa del fitocromo (Pfr) induce la síntesis de GAs mediante un aumento en la expresión del gen que codifica para la enzima GA 3- β hidroxilasa, última enzima comprometida en la síntesis de GAs con actividad biológica (Ogawa, 2003). A diferencia de estas observaciones, la respuesta a las temperaturas alternadas obedece particularmente a una reducción de la

síntesis y de señalización del ABA sin ejercer cambios sobre el metabolismo y señalización de las GAs (capítulos III y IV).

Implicancias sobre futuras investigaciones.

Esta tesis permitió dilucidar el conjunto de mecanismos que permiten la terminación de la dormición por efecto de las temperaturas alternadas. Durante este trabajo fue posible evidenciar el incremento de la capacidad de crecimiento del embrión, los cambios en el balance hormonal y en la expresión de genes involucrados en pasos claves del metabolismo y señalización del ABA y las GAs por efecto de las temperaturas alternadas. No obstante, independientemente del avance sensible en la comprensión de esta respuesta, persisten varios interrogantes por resolver en pos de una comprensión más completa de esta respuesta. Entre ellas podemos mencionar la participación de otras hormonas, de los compuestos ROS y de la actividad de la NADPH oxidasa (estos estudios se encuentran ya en proceso), el sitio de percepción del estímulo y el mecanismo por el cual las semillas perciben las fluctuaciones diarias de temperatura. Para resolver estos últimos interrogantes, Penfield (2008) propuso que los cambios en la fluidez de la membrana celular serían los sitios primarios donde la temperatura es percibida. En la misma revisión, el autor menciona que dos compuestos farmacológicos capaces de incrementar (*i.e.* alcohol bencílico) o reducir la fluidez de la membrana (*i.e.* dimetilsulfóxido) respectivamente, modifican la expresión de genes regulados por la temperatura. Más allá del riesgo de efectos colaterales siempre presentes en este tipo de aproximaciones, la evaluación de la germinación en soluciones de alcohol bencílico bajo temperaturas constantes o con dimetilsulfóxido bajo temperaturas alternadas resulta una manera interesante de profundizar en la materia. Otra línea de trabajo interesante sería la evaluación de la acción del reloj circadiano en la percepción de la alternancia térmica. Si bien un primer intento de hallar un vínculo entre la expresión de genes del reloj circadiano y temperaturas alternadas fue descrito en semillas de *A. thaliana* (Penfield y Hall, 2009), la posibilidad de avanzar sobre la expresión de los genes del reloj circadiano necesarios para la expresión de los genes vinculados al metabolismo del ABA (Seung *et al.*, 2012) sería una nueva y valiosa contribución al conocimiento en esta área de la biología de semillas.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA CITADA

.

.

- Achard, P., Renou, J.P., Berthome, R., Harberd, N.P. y Genschik, P. 2008. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology*, 18: 656–660.
- Alboresi, A., Gestim, C., Leydecker, T., Bedu, M., Meyer, C. y Truong, H.N. 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*, 28: 500–512.
- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M.H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P. y Jullien, M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Island ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219: 479–488.
- Allen, P. S., Benech-Arnold, R. L., Batlla, D. y Bradford, K. J. 2008. Modeling of seed dormancy. Pp. 72–102 en Bradford, K.J. y Nonogaki, H. (eds.) *Seed development, dormancy and germination*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Alvarado, V. y Bradford, K.J. 2002. A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. *Plant, Cell and Environment*, 25: 1061–1069.
- Arana, M.V., de Miguel, L.C. y Sánchez, R.A. 2006. A phytochrome-dependent embryonic factor modulates gibberellins responses in the embryo and micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds. *Planta*, 223: 847–857.
- Arana, M.V., Burgin, M.J., de Miguel, L.C. y Sánchez, R.A. 2007. The very-low-fluence and high-irradiance responses of the phytochromes have antagonistic effects on germination, mannan-degrading activities, and *DfGA3ox* transcript levels in *Datura ferox* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 58: 3997–4004.
- Argyris, J., Dahal, P., Hayashi, E., Still, D.W. y Bradford, K.J. 2008. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. *Plant Physiology*, 148: 926–947.
- Balisky, A.C. y Burton, P.J. 1993. Distinction of soil thermal regimes under various experimental vegetation covers. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 73: 411–420.
- Baskin, J.M. y Baskin, C.C. 1985. The annual dormancy cycle in buried weed seeds: A continuum. *BioScience*, 35: 492–498.
- Baskin, J.M. y Baskin, C.C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14: 1–16.
- Batlla, D., Verges, V. y Benech-Arnold, R.L. 2003. A quantitative analysis of seed responses to cycle – doses of fluctuating temperatures in relation to dormancy: Development of a thermal time model for *Polygonum aviculare* L. seeds. *Seed Science Research*, 13: 197–207.
- Batlla, D., Kruk, B.C. y Benech-Arnold, R.L. 2005. Modeling changes in dormancy in weed soil banks: implications for the prediction of weed emergence. Pp. 245–270 en *Handbook of Seed Physiology Applications to Agriculture*. Benech-Arnold R.L. y Sánchez, R.A. (eds.). Haworth Press, New York.
- Benech-Arnold, R.L., Ghera, C.M., Sánchez, R.A. y Garcia-Fernandez, A.E. 1988. The role of fluctuating temperatures in the germination and establishment of *Sorghum halepense* (L.) Pers. Regulation of germination under leaf canopies. *Functional Ecology*, 2: 311–318.
- Benech-Arnold, R.L., Ghera, C.M., Sánchez, R.A. y Insausti, P. 1990a. Temperature effects on dormancy release and germination rate in *Sorghum halepense* (L.) Pers. seeds: a quantitative analysis. *Weed Research*, 30: 81–89.

- Benech-Arnold, R.L., Ghera, C.M., Sánchez, R.A. y Insausti, P. 1990b. A mathematical model to predict *Sorghum halepense* (L.) Pers. seedling emergence in relation to soil temperature. *Weed Research*, 30: 91-99.
- Benech-Arnold, R. L., Steinbach, H. S., Kristof, G. y Sánchez, R.A. 1995. Fluctuating temperatures have different effects on embryonic sensitivity to ABA in *Sorghum* varieties with contrasting pre-harvest susceptibility. *Journal of Experimental Botany*, 46: 711-717.
- Benech-Arnold, R.L., Sánchez, R.A., Forcella, F., Kruk, B.C. y Ghera, C.M. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research*, 67:105-122.
- Benech-Arnold, R.L., Enciso, S., Sánchez, R.A. y Rodríguez, M.V. 2003. On the hormonal nature of the stimulatory effect of high incubation temperatures on germination of dormant sorghum caryopses. *New Phytologist*, 160: 371-377.
- Benech-Arnold, R.L., Gualano, N., Leymarie, J., Côme, D. y Corbineau F. 2006. Hipoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *Journal of Experimental Botany*, 57:1423-1430.
- Bensen, R.J., Johal, G.S., Crane, V.C., Tossberg, J.T., Schnable, P.S., Meeley, R.B. y Briggs, S.P. 1995. Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *The Plant Cell*, 7: 75-84.
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9: 1055-1066.
- Bewley, J.D. y Black, M. 1994. Cellular events during germination and seedling growth. Pp. 175-235 en Bewley, J.D. y Black, M. (eds.) *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum Press, New York.
- Bliss, D. y Smith, H. 1985. Penetration of light into soil and its role in the control of seed germination. *Plant, Cell and Environment*, 8: 475-483.
- Boddy, L.G., Bradford, K.J. y Fischer, A.J. 2012. Population-based threshold models describe weed germination and emergence patterns across varying temperature, moisture and oxygen conditions. *Journal of Applied Ecology*, 49:1225-1236.
- Bouwmeester, H.J. y Karsen, C.M. 1993. Annual changes in dormancy and germination in seeds of *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. *New Phytologist*, 124: 179-191.
- Bradford, K.J. 1990. A Water Relations Analysis of Seed Germination Rates. *Plant Physiology*, 94: 840-849.
- Bradford, K.J. y Somasco, O.A. 1994. Water relations of lettuce seed thermoinhibition. I. Priming and endosperm effects on base water potential. *Seed Science Research*, 4: 1-10.
- Bradford, K.J. 1995. Water relations in seed germination. Pp. 351-396 en Kigel, J.; Galili, G. (Eds.) *Seed development and germination*. Marcel Dekker, New York.
- Bradford, K.J. 1996. Population based models describing seed dormancy behavior: implications for experimental design and interpretation. Pp. 313-339 en Lang, G. A. (ed.) *Plant dormancy: physiology, biochemistry and molecular biology*. CAB International, Wallingford. UK.
- Bradford, K.J. 2002. Applications of hydrothermal time to quantifying and modeling seed dormancy and germination. *Weed Science*, 50: 248-260.

- Bradford, K.J. 2005. Threshold models applied to seed germination ecology. *New Phytologist*, 165: 338-341.
- Bradford, K.J., Benech-Arnold, R.L., Come, D. y Corbineau, F. 2008. Quantifying the sensitivity of barley seed germination to oxygen, abscisic acid, and gibberellin using a population-based threshold model. *Journal of Experimental Botany*, 59: 335-347.
- Buhler, D.D., Hartzler, R.G. y Forcella, F. 1998. Weed Seed Bank Dynamics: Implications to Weed Management. *Journal of Crop Production*, 1:145-168.
- Cadman, C.S.C., Toorop, P.E., Hilhorst, H.W.M., y Finch-Savage, W.E. 2006. Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seed during cycling through dormant and non-dormant states indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant Journal*, 46: 805-822.
- Carpita, N., Ross, C. y Nabors, M. 1979. The influence of plant growth regulators on the growth of embryonic axes of red and far-red treated lettuce seeds. *Planta*, 145: 511-516.
- Casal, J.J., Sánchez, R.A., Di Benedetto, A.H. y de Miguel, L.C. 1991. Light promotion of seed germination in *Datura ferox* is mediated by a highly stable pool of phytochrome. *Photochemistry and Photobiology*, 53: 249-254.
- Casal, J.J. y Sánchez, R.A. 1998. Phytochromes and seed germination. *Seed Science Research*, 8: 317-329.
- Chen, H., Zhang, J., Neff, M.M., Hong, S.W., Zhang, H., Deng, X.W. y Xiong, L. 2008. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 4495-4500.
- Chiwocha, S.D.S., Cutler, A.J., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Yang, J., Ross, A.R.S. y Kermode, A.R. 2005. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *The Plant Journal*, 42: 35-48.
- Christensen, M., Meyer, S.E. y Allen, P.S. 1996. A hydrothermal time model of seed after-ripening in *Bromus tectorum* L. *Seed Science Research*, 6: 1-9.
- Christensen, M., Meyer, S.E. y Allen, P.S. 1998. A simulation model to predict seed dormancy loss in the field for *Bromus tectorum* L. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1235-1244.
- Cone, J.W., Jaspers, P.A.P.M. y Hendrick, R.E. 1985. Biphase fluence-response curves for light-induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant, Cell and Environment*, 8: 605-612.
- Corbineau, F., Bianco, J., Garelo, G. y Côme, D. 2002. Breakeage of *Pseudotsuga menziesii* seed dormancy by cold treatment as related to changes in seed ABA sensitivity and ABA levels. *Physiologia Plantarum*, 114: 313-318.

- Da Silva, E. A., Toorop, P.E., Van Aelst, A.C. y Hilhorst, H.W.M. 2004. Absciscic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta*, 220:251–261.
- Da Silva, E.A., de Melo, D.L B., Davide, A.C., de Bode, N., Abreu, G.B., Faria, J.M.R. y Hilhorst, H.W.M. 2007. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Annals of Botany*, 99: 823-830.
- Dahal, P., Bradford, K.J. y High, A.M. 1993. The concept of hydrothermal time in seed germination and priming. Pp. 1009-1014 en Côme, D y Corbineau, F. (eds.) Fourth international workshop on seeds: basic and applied aspects of seed biology. ASFIS, Paris.
- de Miguel, L.C. y Sánchez, R.A. 1992. Phytochrome-induced germination, endosperm softening and embryo growth in *Datura ferox* seeds: Sensitivity to low water potential and time to escape to FR reversal. *Journal of Experimental Botany*, 43: 969-974.
- de Miguel, L.C., Burgin, M.J., Casal, J.J. y Sánchez, R.A. 2000. Antagonistic action of low-fluence and high-irradiance modes of response of phytochrome on germination and β -mannanase activity in *Datura ferox* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1127-1133.
- Debeaujon, I. y Koornneef, M. 2000. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic absciscic acid. *Plant Physiology*, 122: 415–424.
- Dutta, S. y Bradford, K.J. 1994. Water relations of lettuce seed thermoinhibition. II. Ethylene and endosperm effects on base water potential. *Seed Science Research*, 4: 11–18.
- Dutta, S., Bradford, K.J. y Nevins, D.J. 1997. Endo- β -mannanase activity present in cell wall extracts of lettuce endosperm prior to radicle emergence. *Plant Physiology*, 113:155–161.
- Ekstam, B. y Forseby, A. 1999. Germination responses of *Phragmites australis* and *Typha latifolia* to diurnal fluctuations in temperature. *Seed Science Research*, 9: 157–163.
- Finch-Savage, W.E. y Leubner-Metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501-523.
- Finch-Savage, W.E. y Footitt, S. 2012. To germinate or not to germinate: a question of dormancy relief not germination stimulation. *Seed Science Research*, 22: 243–248.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. y Steber, C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 387–415.
- Foley, M.E. y Chao, W.S. 2008. Growth regulators and chemicals stimulate germination of leafy spurge. *Weed Science*, 56: 516–522.

- Foley, M.E., Chao, W.S., Dogramaci, M., Horvath, D.P. y Anderson, J.V. 2012. Changes in the transcriptome of dry leafy spurge (*Euphorbia esula*) seeds imbibed at a constant and alternating temperature. *Weeds Science*, 60: 48-56.
- Footitt, S., Douterelo-Soler, I., Clay, H. y Finch-Savage, W. E. 2011. Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 50: 20236- 20241.
- Forcella, F. y Wood, H. 1986. Sequential flowering of thistles (Cynareae, Asteraceae) in southern Australia. *Australian Journal of Botany*, 34: 455-461.
- Gaskin, P., Gilmour, S.J., MacMillan, J. y Sponsel, V.M. 1985. Gibberellins in immature seeds and dark-grown shoots of *Pisum sativum*. Gibberellins identified in the tall cultivar Alaska in comparison with those in the dwarf. *Planta*, 163:283-289.
- Ghersa, C.M., Benech-Arnold, R.L., y Martinez-Ghersa, M.A. 1992. The role of fluctuating temperatures in germination and establishment of *S. halepense* (L.) Pers. II. Regulation of germination at increasing depths. *Functional Ecology*, 6: 460-468.
- Gimeno-Gilles, C., Lelièvre, E., Viau, L., Malik-Ghulam, M., Ricoult, C., Niebel, A., Leduc, N. y Limami, A.M. 2009. ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Molecular Plant*, 2: 108-119.
- Gonai, T., Kawahara, S., Tougou, M., Satoh, S., Hashiba, T., Hirai, N., Kawaide, H., Kamiya, Y. y Yoshioka, T. 2004. Absciscic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *Journal of Experimental Botany*, 55: 111-118.
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G. y Soppe, W.J.J. 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell and Environment*, 35, 1769-1786.
- Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E. y Jullien, M. 2000. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia* post imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta*, 210: 279-285.
- Groves, R.H. y Kaye, P.E. 1989. Germination and phenology of seven introduced thistle species in southern Australia. *Australian Journal of Botany*, 37: 351-359.
- Gualano, N., Carrari, F., Rodríguez, M.V., Pérez-Flores, L., Sánchez, R.A., Iusem, N. y Benech-Arnold, R.L. 2007. Reduced embryo sensitivity to abscisic acid in a sprouting susceptible Sorghum (*Sorghum bicolor*) variety is associated with altered ABA signalling. *Seed Science Research*, 17:81-90.
- Gummerson, R.J. 1986. The effect of constant temperatures and osmotic potential on the germination of sugar beet. *Journal of Experimental Botany*, 41: 1431-1439.
- Harper, J.L. 1959. The ecological significance of dormancy and its importance in weed control. Pp. 415-420 Vol 4 en *Proceedings of the IVth International Congress of Crop Protection*. Hamburgo. Alemania.
- Harris, L.J., Saparno, A., Johnston, A., Pristic, S., Xu, M., Allard, S., Kathiresan, A., Outlet, T. y Peters, R.J. 2005. The maize *An 2* gene is induced by *Fusarium*

- attack and encode an ent-copalyl diphosphate synthase. *Plant Molecular Biology*, 59: 881-894.
- Hartmann, K.M. 1966. A general hypothesis to interpret "high energy phenomena" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochemistry Photobiology*, 5: 349-366.
- Hartweck, L.M. 2008. Gibberellin signaling. *Planta*, 229: 1-13.
- Helliwell, C.A., Poole, A., Peacock, W. J. y Dennis, E. S. 1999. *Arabidopsis ent-*kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, 119: 507-510.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S. y Peacock, W.J. 2001. The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellins biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 2065-2070.
- Hilhorst, H.W.H. y Karsen, C.M. 1992. Dual effect of light on the gibberellic and nitrate stimulated seed germination of *Sisymbrium officinale*. *Plant Physiology*, 86: 591-597.
- Hilhorst, H.W.K. 1995. A critical update on seed dormancy I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5: 61-73.
- Hilhorst, H.W.M. 2008. Definitions and hypotheses of seed dormancy. Pp. 50-71 en Bradford, K.J. y Nonogaki, H. (eds.) *Seed development, dormancy and germination*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Hilhorst, H.W.M., Finch-Savage, W.E., Buitink, J., Bolingue, W y Leubner-Metzger, G. 2010. Dormancy in Plant Seeds. Pp. 43-68 en Lubzens, E., Cerda, J., Clark, M. (eds.). *Dormancy and resistance in harsh environments. Topics in Current Genetics* 21, Springer-Verlag. Berlin. Alemania.
- Holdsworth, M., Bentsink, L. y Soppe, W.J.J. 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, afterripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179: 33-54.
- Hu, X.W., Huang, X.H. y Wang, Y.R. 2012. Hormonal and temperature regulation of seed dormancy and germination in *Leymus chinensis*. *Plant Growth Regulation*, 67:199-207.
- Huarte, H.R y Benech-Arnold, R.L. 2003. Understanding mechanisms of reduced annual weed emergence in alfalfa. *Weed Science*, 51: 876-885.
- Iglesias-Fernández, R. y Matilla, A. 2009. After-ripening alters the gene expression pattern of oxidases involved in the ethylene and gibberellin pathways during early imbibition of *Sisymbrium officinale* L. seeds. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1645-1661.
- Iglesias-Fernández, R., Rodríguez-Gacio, M.C. y Matilla, A. J. 2011. Progress in research on dry afterripening. *Seed Science Research*, 21: 69-80.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sentoku, N., Kitano, H., Matsuoka, M. y Kobayashi, M. 1999. The gene encoding gibberellin 3 β -hydroxylase is expressed at the site of

- GA action during stem elongation and floral organ development. *The Plant Journal*, 20: 15-24.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sentoku, N., Kitano, H., Matsuoka, M. y Kobayashi, M. 2001. Cloning and functional analysis of two gibberellins 3 β -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 8909-8914.
- Itoh, H., Tatsumi, T., Sakamoto, T., Otomo, K., Toyomasu, T., Kitano, H., Ashikari, M., Ichihara, S. y Matsuoka, M. 2004. A rice semi-dwarf gene, *Tan-Ginbozu* (D35), encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, ent-kaurene oxidase. *Plant Molecular Biology*, 54: 533-547.
- Jacobsen, S.E. y Olszewski, N.E. 1993. Mutations at the SPINDLY locus of *Arabidopsis* alter gibberellins signal transduction. *Plant Cell*, 5: 887-895.
- Karsen, C.M. 1982. Seasonal patterns of dormancy in weed seeds. Pp. 243-270 en Khan, A.A. (ed.) *The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. Holanda.
- Karsen, C., Brinkhorst-van der Swan, D., Breckland, A. y Koorneef M. 1983. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid-deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L) Hynh. *Planta*, 157: 158-165.
- Karsen, C.M., Zagorsky, S., Kepczynski, J. y Groot, S.P.C. 1989. Key role for endogenous gibberellins the control of seed germination. *Annals of Botany*, 63: 71-80.
- Kebreab, E. y Murdoch, A.J. 1999. Modelling the effects of water stress and temperature on germination rate of *Orobanche aegyptiaca* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 50: 655-664.
- Kruk, B.C. y Benech-Arnold, R.L. 2000. Evaluation of dormancy and germination responses to temperature in *Carduus acanthoides* and *Anagallis arvensis* using a screening system, and relationship with field-observed emergence patterns. *Seed Science Research*, 10: 77-88.
- Kucera, B., Cohn, M.A. y Leubner-Metzger, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15: 281-307.
- Le Page-Degivry, M.T. y Garello, G. 1992. In situ abscisic acid synthesis. *Plant Physiology*, 98: 1386-1390.
- Le Page-Degivry, M.T., Bianco, J. y Barthe, P. 1997. Changes in abscisic acid biosynthesis and catabolism during dormancy breaking in *Fagus sylvatica* embryo. *Journal of Plant Growth Regulation*, 16: 57-61.
- Le Page-Degivry, M.T., Bianco, J., Barthe, P. y Garello, G. 1996. Change in hormone sensitivity in relation to the onset and breaking of sunflower dormancy. Pp. 221-231 en Lang, G.A. (Ed.) *Plant dormancy physiology, biochemistry and molecular biology*. CAB International, Wallingford, UK.

- Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.Y., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M. y Lee, I.J. 2006. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, 126:1109–1120.
- Leubner-Metzger, G. 2001. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta*, 213: 758–763.
- Leubner-Metzger, G. 2003. Hormonal and molecular events during seed dormancy release and germination. Pp 101-112 en Nicolás, G., Bradford, K.J., Come, D. y Pritchard, H. (Eds.) *The biology of seeds: Recent research advances*. CAB International Publishing, Wallingford. UK.
- Li, B.L. y Foley, M.E. 1997. Genetic and molecular control of seed dormancy. *Trends in Plant Science*, 2: 384–389.
- Linkies, A., Müller, K., Morris, K., Turecková, V., Wenk, M., Cadman, C.S.C., Corbineau, F., Strnad, M., Lynn, J.R., Finch-Savage, W.E. y Leubner-Metzger G. 2009. Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 21:3803–3822.
- Linkies, A., Graeber, K., Knight, Ch. y Leubner-Metzger, G. 2010. The evolution of seeds. *New Phytologist*, 186: 817–831.
- Linkies, A. y Leubner-Metzger, G. 2012. Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports*, 31:253–270.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D.T., Chait, B.T. y Chua, N.H. 2002. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *The Plant Journal*, 32:317–28.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., Kinoshita, N. y Chua N.H. 2003. AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes and Development* 17: 410–418.
- Martin, D. N., Proebsting, W. M. y Hedden, P. 1997. Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the Le alleles and function of the expressed proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 8907-8911.
- Matakiadis, T., Alboresi, A., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J.P., Kamiya, Y., Nambara, E. y Truong H.N. 2009. The *Arabidopsis* abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiology*, 149: 949–960.
- Matilla, A.J. 2000. Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research*, 2: 111–126.
- Matilla, A.J. y Matilla-Vázquez, M.A. 2008. Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Science*, 175:87–97.
- Mendiondo, G.M., Leymarie, J., Farrant, J.M., Corbineau, F., y Benech-Arnold, R.L. 2010. Differential expression of abscisic acid metabolism and signalling genes

induced by seed-covering structures or hypoxia in barley (*Hordeum vulgare* L.) grains. *Seed Science Research*, 20: 69-76.

Mendiondo, G.M. 2009. Control de la expresión de la dormición en cereales por la temperatura: Análisis molecular en semillas de sorgo granífero y cebada cervecera. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Michel, B. E. 1983. Evaluation of water potential of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology*, 72: 66-70.

Millar, A.A., Jacobsen, J.V., Ross, J.J. Helliwell, C.A., Poole, A.T., Scofield, G., Reid, J.B. y Gubler, F. 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8-hydroxylase. *The Plant Journal*, 45: 942–954.

Murdoch, A.J., Roberts, E.H. y Goedert, C.O. 1989. A model of germination responses to alternating temperatures. *Annals of Botany*, 63: 97–111.

Nambara, E., Akazawa, T. y McCourt, P. 1991. Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazole on mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 97: 736–738.

Nambara, E., Hayama, Y., Tsuchiya, Y., Nishimura, M., Kawaide, H., Kamiya, Y. y Naito, S. 2000. The role of ABI3 and FUS3 loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. *Developmental Biology*, 220: 412-423.

Nambara, E. y Marion-Poll, A. 2003. ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science*, 8: 213–217.

Nambara, E. y Marion-Poll, A. 2005. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 165–185.

Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M. y Kamiya, Y. 2010. Absciscic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, 20: 55-67.

Nascimento, W.M., Cantliffe, D.J. y Huber D.J. 1999. Endo- β -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature in response to ethylene. Pp 191–192, en: Kanellis, A.K., Chang, C., Klee, H., Bleecker, A.B., Pech, J.C., Grierson, D. (Eds.) *Biology and biotechnology of the plant hormone Ethylene*. Springer, Holanda.

Neff, M. M., Fankhauser, C. y Chory, J. 2000. Light: an indicator of time and place. *Genes and Development*, 14: 257-271.

Ni, B.R. y Bradford, K.J. 1992. Quantitative models characterizing seed germination responses to absciscic acid and osmoticum. *Plant Physiology*, 98: 1057–1068.

- Ni, B.R. y Bradford K.J. 1993. Germination and dormancy of abscisic acid and gibberellin-deficient mutant tomato seeds. Sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin, and water potential. *Plant Physiology*, 101: 607-617.
- Nikolaeva, M.G. 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. Pp. 51-74 en Khan, A.A. (Ed.) *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. North Holland, Amsterdam. Holanda.
- Nonogaki, H., Nomaguchi, M., Morohashi, Y. y Matsushima H. 1998. Development and localization of endo- β -mannanase in the embryo of germinating and germinated tomato seeds. *Journal of Experimental Botany*, 49:1501-1507.
- Nonogaki, H. 2006. Seed Germination. The biochemical and molecular mechanisms. *Breeding Science*, 56: 93-105.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. y Yamaguchi, S. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell*, 15: 1591-1604.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H.S., Sun, T., Kamiya, Y. y Choi G. 2007. PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, 19: 1192-208.
- Penfield, S. 2008. Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytologist*, 179: 615-628.
- Penfield, S. y Hall, A. 2009. A role for multiple circadian clock genes in the response to signals that break seed dormancy in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21: 1722-1732.
- Penfield, S. y King, J. 2009. Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination. *Proceedings of the Royal Botanical Society*, 276: 3561-3569.
- Petruzzelli, L., Kunz, C., Waldvogel, R., Meins, F. y Leubner-Metzger, G. 1999. Distinct ethylene and tissue-specific regulation of beta-1,3-glucanases and chitinases during pea seed germination. *Planta*, 209:195-201.
- Phillips, A., Ward, D., Uknes, S., Appleford, N., Lange, T., Huttly, A., Gaskin, P., Graebe, J. y Hedden, P. 1995. Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 108: 1049-1057.
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y. y Lopez-Molina, L. 2008. The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell*, 20: 2729-2745.
- Pons, T.L. y Schroder, H.F.J.M. 1985. Significance of temperature fluctuation and oxygen concentration for the germination of the rice field weeds *Fimbristylis littoralis* and *Scirpus juncoides*. *Oecologia*, 69: 315-319.

- Pons, T.L. 2000. Seed responses to light. Pp. 237- 259 en Fenner, M. (Ed.) Seeds. The ecology of regeneration in plant communities. Second Edition. CAB Publishing, Wallingford. UK.
- Prisic, S., Xu, M., Ross-Wilderman, P. y Peters, R. J. 2004. Rice contains two disparate *ent*-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant Physiology*, 136: 4228-4236.
- Probert, R.J., Smith, R.D. y Birch, P. 1986. Germination responses to light and alternating temperatures in European populations of *Dactylis glomerata* V. The principal components of alternating temperatures requirements. *New Phytologist*, 102: 133-142.
- Probert, R.J., Gajjar, K.H. y Haslam, I.K. 1987. The interactive effects of phytochome, nitrate and thiourea on the germination response to alternating temperatures in seeds of *Ranunculus sceleratus* L.: A quantal approach. *Journal of Experimental Botany*, 38: 1012–1025.
- Probert, R.J. 1992. The role of temperature in germination ecophysiology. Pp. 285-325 en Fenner, M. (Ed.) Seeds. The ecology of regeneration in plant communities. CAB International, Wallingford. UK.
- Probert, R.J. 2000. The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. Pp. 261-292 en Fenner, M. (Ed.) Seeds. The ecology of regeneration in plant communities. Second Edition. CAB Publishing, Wallingford. UK.
- Rademacher, W. 2000. Growth Retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 501-531.
- Roberts, E.H. y Totterdell, S. 1981. Seed dormancy in *Rumex* species in responses to environmental factors. *Plant, Cell and Environment*, 4: 97-106.
- Rodríguez, M.V., Mendiando, G.M., Maskin, L., Gudesblat, G.E., Iusem, N.D. y Benech-Arnold, R. L. 2009. Expression of ABA signalling genes and ABI5 protein levels in imbibed *Sorghum bicolor* caryopses with contrasting dormancy and at different developmental stages. *Annals of Botany*, 104: 975–985.
- Romagosa, I., Prada, D., Moralejo, M.A., Sopena, A., Muñoz, P., Casas, A.M., Swanston, J.S. y Molina-Cano, J.L. 2001. Dormancy, ABA content and sensitivity of a barley mutant to ABA application during seed development and after ripening. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1499–1506.
- Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, I., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G.K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M. y Matsuoka, M. 2004. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in Rice. *Plant Physiology*, 134: 1642-1653.

- Sánchez, R.A. y de Miguel, L. 1997. Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of the embryo and gibberellin synthesis. *Seed Science Research*, 7: 27–34.
- Sawada, Y., Katsumata, T., Kitamura, J., Kawaide, H., Nakajima, M., Asami, T., Nakaminami, K., Kurahashi, T., Mitsunashi, W., Inoue, Y. y Toyomasu, T. 2008. Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content, rather than of gibberellin responsiveness. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3383–3393.
- Schwartz, S.H., Qin, X. y Zeevaart, J.A.D. 2003. Update on abscisic acid biosynthesis elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology*, 131:1591–1601.
- Scopel, A.L., Ballaré, C.L. y Sánchez, R.A. 1991. Induction of extreme light sensitivity in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivations. *Plant, Cell and Environment*, 14: 501–508.
- Seiler, C., Harshavardhan, V.T., Rajesh, K., Reddy, P.S., Strickert, M., Rolletschek, H., Scholz, U., Wobus, U. y Sreenivasulu, N. 2011. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 62: 2615–2632.
- Seo, M., Hanada, A., Kuwahara, A., Endo, A., Okamoto, M., Yamauchi, Y., North, H., Marion-Poll, A., Sun, T., Koshiba, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. y Nambara, E. 2006. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome-regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellins metabolism. *Plant Journal*, 48: 354–366.
- Serrani, J.C., Sanjuan, R., Ruiz-Rivero, O., Fos, M. y García-Martínez, J.L. 2007. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiology*, 145: 246–257.
- Seung, D., Matte Risopatrón, J.P., Jones, B.J. y Marc, J. 2012. Circadian clock-dependent gating in ABA signalling networks. *Protoplasma*, 249:445–457.
- Shinomura, T. 1997. Phytochrome regulation of seed germination. *Journal of Plant Research*, 110: 151–161.
- Shinomura, T., Uchida, K., y Furuya, M. 2000. Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122: 147–156.
- Soriano, A., De Eiberg, B.A. y Slabnik, E. 1963. Comportamiento de la germinación de semillas de malezas anuales. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, 17: 447–463.

- Steber, C. M. y McCourt, P. 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 125: 763–769.
- Steber, C. M. 2008. De-repression of seed germination by GA signaling. Pp. 248-263 en Bradford, K. J. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed development, dormancy and germination*. Annual Plant Review, Volume 27. Blackwell Publishing, Oxford, UK:
- Steinbach, H.S., Benech-Arnold, R.L., Kristof, G., Sánchez, R.A. y Marcucci-Poltri, S. 1995. Fluctuating temperatures have different effects on embryonic sensitivity to ABA in *Sorghum* varieties with contrasting pre-harvest sprouting susceptibility. *Journal of Experimental Botany*, 46: 711–717.
- Steinbach, H.S., Benech-Arnold, R.L. y Sánchez, R.A. 1997. Hormonal regulation of dormancy in developing *Sorghum* seeds. *Plant Physiology*, 113: 149-154.
- Steinbauer, G.P. y Grigsby, B. 1957. Interaction of temperature light, and moisture agent in the germination of weeds seeds. *Weeds*, 5:175-183.
- Stone, S.L., Williams, L., Farmer, L.M., Vierstra, R.D. y Callis J. 2006. KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for *Arabidopsis* growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 18: 3415–3428.
- Sun, T. y Kamiya, Y. 1994. The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase entkaurene synthetase a of gibberellin biosynthesis. *The Plant Cell*, 6: 1509-1518.
- Sung, Y., Cantlife, D.J., Nagata, S.T. y Nascimento, W.M.. 2008. Structural changes in lettuce seed during germination at high temperature altered by genotype, seed maturation temperature, and seed priming. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, 133: 300–311.
- Tanaka-Ueguchi, M., Itoh, H., Oyama, N., Koshioka, M. y Matsuoka, M. 1998. Overexpression of a tobacco homeobox gene, *NTH15*, decreases the expression of a gibberellin biosynthetic gene encoding GA 20-oxidase. *The Plant Journal*, 15: 391–400.
- Tester, M. y Morris, C. 1987. The penetration of light through soil. *Plant, Cell and Environment*, 10: 281–286
- Thompson, K. y Grime, J.P. 1983. A comparative study of responses to diurnally-fluctuating temperatures. *Journal of Applied Ecology*, 20:141-156.
- Toh, S., Imamura, A., Watanabe, A., Nakabayashi, K., Okamoto, M., Jikumaru, Y., Hanada, A., Aso, Y., Ishiyama, K., Tamura, N., Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Nambara, E. y Kawakami, N. 2008. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*, 146:1368–1385.

- Totterdell, S. y Roberts, E. H. 1980. Characteristics of alternating temperatures which stimulate loss of dormancy in seeds of *Rumex obtusifolius* L. and *Rumex crispus* L. *Plant, Cell and Environment*, 3: 3–12.
- Toyomasu, T., Tsuji, H., Yamane, H., Nakayama, M., Yamaguchi, I., Murohushi, N., Takahashi, N. y Inoue, Y. 1993. Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. *Journal of Plant Growth Regulation*, 12:85–90.
- Toyomasu, T., Yamane, H., Murofushi, N. y Inoue, Y. 1994. Effects of exogenously applied gibberellin and red light on the endogenous levels of abscisic acid in photoblastic lettuce seeds. *Plant and Cell Physiology*, 35: 127–129.
- Toyomasu, T., Kawaide, H., Mitsunashi, W., Issue, Y. y Kamiya, Y. 1998. Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology*, 118:1517–1523.
- Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. y Shinozaki, K. 2006. CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 46: 171–182.
- Umezawa, T., Hirayama, T., Kuromori, T., Shinozaki, K. 2011. The regulatory networks of plant responses to abscisic acid. *Advances in Botanical Research*, 57:201–248.
- Van Der Schaar, W., Alonso-Blanco, C., Léon-Kloosterziel, K.M., Jansen, R.C., Van Ooijen, J.W. y Koornneef, M. 1997. QTL analysis of seed dormancy in *Arabidopsis* using recombinant inbred lines and MQM mapping. *Heredity*, 79: 190–200.
- Van Esso, M. L., Ghera, C. M. y Soriano, A. 1986. Cultivation effects on the dynamics of a Johnsongrass seed population in the soil profile. *Soil and Tillage Research*, 6: 325–335.
- Wall, J.K. y Johnson, C.B. 1983. An analysis of phytochrome action in the “high irradiance response”. *Planta*, 159: 387–397.
- Watt, M.S., Bloomberg, M. y Finch-Savage, W.E. 2011. Development of a hydrothermal time model that accurately characterises how thermoinhibition regulates seed germination. *Plant, Cell and Environment*, 34: 870–876.
- Welbaum, G.E., Bradford, K.J., Yim, K., Booth, D.T. y Oluoch, M.O. 1998. Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. *Seed Science Research*, 8: 161–172.
- Yamaguchi, S., Saito, T., Abe, T., Yamane, T., Murofushi, T., y Kamiya, Y. 1996. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme *ent*-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.). *The Plant Journal*, 10: 203–213.
- Yamaguchi, S., Smith, M.W., Brown, R.S.G., Kamiya, Y. y Sun, T.P. 1998. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3β-

- hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, 10: 2115-2126.
- Yamaguchi, S., Kamiya, Y. y Sun, T.P. 2001. Distinct cell-specific expression pattern of early and late gibberellins biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal*, 28: 443-454.
- Yamaguchi, S. y Kamiya, Y. 2002. Gibberellins and light-stimulated seed germination. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20: 369-376.
- Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 225-251.
- Yamaguchi, S., Kamiya, Y. y Nambara, E. 2008. Regulation of ABA and GA levels during seed development and germination in *Arabidopsis*. Pp. 224-247 en Bradford, K. J. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed development, dormancy and germination. Annual Plant Review*, 27. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, A. y Yamaguchi, S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell*, 16: 367-378.
- Yamauchi, Y., Takeda-Kamiya, N., Hanada, A., Ogawa, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kamiya, Y. y Yamaguchi, S. 2007. Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiology*, 48: 555-561.
- Yang, Y., Nagatani, A., Zhao, Y., Kendrick, R. y Kamiya, Y. 1995. Effects of gibberellins on seed germination of phytochrome deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 36: 1205-1211.
- Yoshioka, T., Endo, T. y Satoh, S. 1998. Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 39: 307-312.
- Zeevaart, J.A.D. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 439-473.